



대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

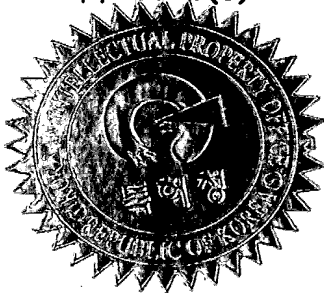
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 21070 호
Application Number PATENT-2000-0021070

출원년월일 : 2000년 04월 20일
Date of Application APR 20, 2000

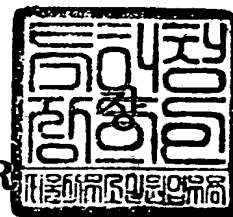
출원인 : 류왕식
Applicant(s) RYU, WANG-SHICK



2001 년 07 월 03 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.04.20
【발명의 명칭】	유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터
【발명의 영문명칭】	Recombinant HBV plasmid vector for gene therapy
【출원인】	
【성명】	류왕식
【출원인코드】	4-2000-007603-9
【대리인】	
【성명】	이후동
【대리인코드】	9-1998-000649-0
【포괄위임등록번호】	2000-021928-8
【발명자】	
【성명】	류왕식
【출원인코드】	4-2000-007603-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정종근
【성명의 영문표기】	JEONG, Jong Keun
【주민등록번호】	710510-1785922
【우편번호】	136-044
【주소】	서울특별시 성북구 삼선동4가 73번지 코오롱아파트 105동 1703호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이제한
【성명의 영문표기】	LEE, Je Han
【주민등록번호】	730504-1155729
【우편번호】	411-311
【주소】	경기도 고양시 일산구 강선마을 108동 1404호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조우영
【성명의 영문표기】 CHO, Woo Young
【주민등록번호】 720712-1063625
【우편번호】 135-090
【주소】 서울특별시 강남구 삼성동 123-13
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 윤계순
【성명의 영문표기】 YOON, Gye Soon
【주민등록번호】 620110-2023328
【우편번호】 463-500
【주소】 경기도 성남시 분당구 구미동 롯데 선경아파트 405동 402호
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 008
【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이후동 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 43 면 43,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 9 항 397,000 원
【합계】 469,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 140,700 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간 세포에만 특이적으로 감염하여 이중 유전자를 전달 및 발현할 수 있는 유전자 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다. B형 간염 바이러스는 간 세포에만 선택적으로 감염하므로 본 발명에서 제공하는 재조합 바이러스는 간 세포에만 선택적으로 감염하여 치료용 유전자를 전달하는 특성이 있으므로 in vivo 치료가 가능한 장점이 있다. 본 발명에서 제공하는 벡터는 바이러스의 복제에 필요한 시스-엘리먼트는 갖고 있으나 복제에 필요한 바이러스 단백질의 ORF(open reading frame)가 결손되어 이를 발현할 수 없으므로 복제 가능한 B형 간염 바이러스를 생산할 가능성은 없다. 하지만, 복제에 필수적인 코아 단백질 및 폴리머라제가 제공되면 야생형과 마찬가지로 유전자 복제가 일어나므로 재조합 바이러스의 생산이 가능하다. 본 발명에 의하여 생산된 이중 유전자가 삽입된 재조합 바이러스는 in vivo 혹은 ex vivo 유전자 치료 프로토콜에 의해 환자의 간 세포에 치료용 유전자를 전달할 수 있다.

【대표도】

도 6

【색인어】

B형 간염 바이러스, 재조합 플라스미드 벡터, 유전자 치료

【명세서】**【발명의 명칭】**

유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터{Recombinant HBV plasmid vector for gene therapy}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 B형 간염 바이러스의 감염주기를 나타낸 그림.

도 1b는 B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 도식화한 것.

도 1c는 B형 간염 바이러스의 유전자 복제과정을 도식화한 것.

도 2a는 B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 발현하는 플라스미드를 제조하기 위한 모식도.

도 2b는 B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 발현하는 플라스미드를 제조하기 위한 프라이머 염기 서열과 PCR 전략을 나타낸 것.

도 3a는 세포에 트랜스팩션된 플라스미드에 의해 B형 간염 바이러스 프리게노믹RNA의 캡시드화 여부를 확인하기 위한 실험 과정을 도식화한 것.

도 3b는 세포에 트랜스팩션된 플라스미드에 의해 B형 간염 바이러스 프리게노믹 RNA의 캡시드화 여부를 알아보기 위한 실험에서 사용한 플라스미드의 유전자 지도를 도식화한 것.

도 3c는 세포에 트랜스팩션된 플라스미드에 의해 B형 간염 바이러스 프리게노믹 RNA의 캡시드화 여부를 RNase 프로텍션 법(Protection Assay)으로 알아본 결과.

도 4는 B형 간염 바이러스의 유전자 중 시스-엘리먼트를 규명하기 위하여 제작한 결손 변이체의 결손 위치 및 복제 여부를 요약한 그림.

도 5a는 B형 간염 바이러스 결손 변이체의 복제 여부를 알아보기 위한 실험 과정을 나타낸 것.

도 5b는 B형 간염 바이러스 결손 변이체의 복제 여부를 HBV 프루브(probe)로 써던 블릿한 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

도 6은 B형 간염 바이러스의 복제에 필요한 시스-엘리먼트와 이중 유전자 삽입 가능 부위와 삽입가능 유전자 크기를 도식화한 것.

도 7a는 이중 유전자(GFP; green fluorescent protein)가 삽입된 HBV 재조합 벡터를 제조하기 위한 과정을 나타낸 모식도.

도 7b는 이중 유전자(GFP; green fluorescent protein) 절편을 만들기 위한 프라이머 염기 서열과 PCR 전략을 나타낸 것.

도 7c는 이중 유전자(GFP; green fluorescent protein) 삽입부위 선정과 삽입 전략을 나타낸 것.

도 8a는 이중 유전자(GFP)가 삽입된 HBV 재조합 벡터 R704 (pCMV-HBV/GFP)의 복제 여부를 HBV 프루브로 확인한 써던 블릿 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

도 8b는 이중 유전자(GFP)가 삽입된 가 삽입된 HBV 재조합 벡터 R704(pCMV-

HBV/GFP)의 복제 여부를 GFP프루브로 확인한 써던 블롯 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<18> 본 발명은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간 세포에만 특이적으로 적중하여 유용한 유전자를 발현시킬 수 있는 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다.

<19> 일반적으로 유전자 치료 벡터는 세포내의 유전자 발현의 이상으로 인한 많은 질환을 근본적으로 치유할 수 있어서 차세대 치료요법으로 인식되고 있다(Anderson, 1992. *Science* 256, 808-13 ; Mulligan, *Science* 260, 926-32. 1993). 유전자 치료법은 아직 상업화되지 않았지만 게놈프로젝트의 완성으로 그 중요성이 더욱 부각되어 많은 바이오 테크회사와 대학병원에서 관심을 갖고 연구 개발이 진행되고 있다. 유전자 치료는 치료용 유전자를 목적세포(target cell)에 효율적으로 안전하게 전달하는 것이 관건이다 (Anderson, *Nature* 392, 25-30. 1998). 현재 유전자 치료는 크게 레트로바이러스 또는 아데노바이러스등의 바이러스를 이용하거나 리간드 또는 양이온성 리포솜 등의 물리적 벡터로 분류할 수 있다(Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1999). 이중 유전자(heterologous gene)를 치료용 목적으로 이용하는데 있어서
중

요한 목표는 목적하는 세포에 특이적으로 적중하는 것과 치료효과의 지속성이다. 그러나 세포 특이성의 결핍과 비효율적인 유전자 전달은 유전자 치료의 주요 개선점으로 대두되어 왔다(Crystal, Science 270, 404-10.1995). 뿐만 아니라 증상이 완화되거나 완치될 때까지 치료용 유전자 산물의 효과가 지속될 수 있게 하는 것도 중요한 문제이고, 대부분의 벡터가 세포에서 소멸 및 분해되는 지속성의 부족도 문제가 되어 그 효과를 더욱 낮게 하는 문제점이 있었다.

<20> 현재 주로 사용되고 있는 유전자 전달시스템은 유전자의 효율적인 전달을 위하여 바이러스에서 유래한 벡터들을 주로 사용한다(Smith, *Annu Rev Microbiol* 49, 807-38.1995). 이들은 병원성이 없으며 바이러스 증식으로 인한 위험을 방지하기 위하여 복제능(replication defective)이 없게 고안된 바이러스 벡터이다.

<21> 현재 임상연구에서 가장 많이 사용되는 벡터는 레트로바이러스와 아데노바이러스 벡터이다. 그러나 이들 바이러스 유래 벡터는 대상세포에 효율적으로 유전자를 전달하여 발현하기에는 이상적이지 못한 단점이 있다(Marshall,

Science 269, 1050, 1052-5.1995). 우선, 레트로바이러스는 대상세포의 게놈에 통합(integration)되어 지속적으로 발현하는 장점이 있지만, 낮은 titer와 단지 분열하는 세포의 게놈에만 통합하는 제한성으로 인하여 in vivo 치료에는 사용되기 어렵다. 반면, 아데노바이러스는 매우 높은 titer 와 효율적인 유전자 전달능력 그리고 분열하지 않은 세포에도 유전자를 전달하는 장점이 있다. 그러나 발현이 지속적이지 못하고 숙주에 면역반응을 유발하는 문제점이 있다. 더군다나, 치료효과를 유도하기 위하여 필수적으로 수반되는 반복적인 투여는 극심한 면역반응을 유발하는 부작용이 있다(Chirmule *et al.*, J. (1999). *Gene Ther* 6, 1574-83. 1999). 이러한 문제점 때문에 레트로바이러스와 아데노바이러스 벡터는 임상적으로 사용되기에는 많은 개선이 필요하다는 보고가 있다 (Crystal, 1995; Marshall, 1995).

<22> 또한, 현재 임상연구에서 가장 많이 사용되는 레트로바이러스와 아데노바이러스 벡터는 세포특이성이 없다(Crystal, 1995). 더욱이, 이들 바이러스는 간 세포에 대한 특이성이 없는 바이러스라는 문제점이 있다.

<23> 한편, HBV를 유전자 치료벡터로 개발하려는 시도는 과거에도 있었다 (Chaisomchit *et al.*, *Gene Ther* 4, 1330-40. 1997). 그러나 상기 보고는 시스-엘리먼트에 대한 정보가 없이 설계되어 일반적으로 외부 유전자를 삽입하게 설계된 것은 아니다. 더욱이, 이 경우 매우 작은 유전자(267bp)를 삽입한 경우로 진정한 유전자 치료용 벡터라고 분류되기 어렵다.

<24> 이에 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 간 세포에만 선택적으로 감염하는 B형 간염 바이러스의 특성을 활용하여 B형 간염 바이러스의 유전자 치료벡터의 개발의 필요성이 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <25> 본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 간 세포에만 특이적으로 감염하여 이중 유전자를 전달 및 발현할 수 있는 유전자 치료용 유전자 재조합 B형 간염 바이러스 벡터를 제공하는 것이다.
- <26> 본 발명의 다른 목적은 복제에 불필요한 부위(dispensable region)를 규명하여 외부 치료용 유전자를 삽입할 부위를 규명하여 HBV벡터 설계에 필요한 정보를 제공하고, HBV복제에 필요한 시스-엘리먼트들을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <27> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HBV 유전자를 포함하는 재조합 HBV 벡터인 R015(pCMV-HBV/30)유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터를 제공한다.
- <28> 상기의 벡터는 서열정보 1에 기재된 벡터인 것이 바람직하다.
- <29> 또한, 본 발명은 하기 실시예 1-3에서 제조한 R015(pCMV-HBV/30) 플라스미드를 이용하여 결손 변이체(deletion mutant)를 제조하였고, 결손 변이체 플라스미드의 결손 부위를 나타내는 각 염기 번호는 HBV ayw 서브타입(subtype)의 염기 서열을 HBV 내의 제한 효소 *EcoRI* 위치를 1번으로 하여 3182번까지 표기한 것이다(Galibert, et al., *Nature* 281, 646-50. 1979). 본 발명자들이 실시예 1에서 만든 R015(pCMV-HBV/30)는 이러한 HBV염기 중 1820을 1번으로 하여 염기 서열을 정한 것이다. 즉, R015에서 서열번호 1번은 프리-게노믹 RNA의 전사시작 자리를 나타낸 것이다.
- <30> 또 본 발명은 상기의 HBV 유전자가 복제에 필요한 일부분의 유전자가 결손된 HBV

유전자인 플라스미드 벡터를 제공한다.

- <31> 상기의 복제에 필요한 일부분의 유전자가 결손된 벡터는 R021, R022, R045, R028, R035 및 R029으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종의 벡터인 것이 바람직하다.
- <32> 여기서 R021은 서열정보 1에 기재된 R015 염기서열 중 640에서 998까지가 결손된 것이고, R022는 843에서 1363, R045는 1020에서 1363, R028은 2782에서 3167, R035는 2970에서 3167, R029는 3167에서 3247까지 결손된 것이다.
- <33> 또한 본 발명은 상기의 HBV 유전자가 복제에 불필요한 일부분의 유전자가 결손된 HBV 유전자인 플라스미드 벡터를 제공한다.
- <34> 상기의 복제에 불필요한 일부분의 유전자가 결손된 벡터는 R044, R023, R040, R041, R025, R026 및 R027로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종의 벡터인 것이 바람직하다.
- <35> 여기서 R044는 서열정보 1의 R015 염기서열 중 1233에서 1363까지가 결손된 것이고, R023은 1363에서 1492, R040은 1492에서 1853, R041은 1853에서 2190, R025는 2190에서 2601, R026은 2601에서 2737, R027은 2737에서 2782까지가 결손된 것이다.
- <36> 또한 본 발명은 이중 유전자를 삽입하기 위해 R015 염기서열 중 1233에서 2737까지가 결실된 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터를 제공한다.
- <37> 또한 본 발명은 상기의 벡터에 이중 유전자인 녹색형광단백질이 삽입된 재조합 HBV 벡터인 서열정보 2에 기재된 R704 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터를 제공한다.
- <38> 여기서 상기의 벡터는 HBV 유전자 복제에 필요한 코아 단백질과 폴리머레이즈가 제

공되면 이중 유전자가 삽입하여도 복제가 가능하다.

- <39> 상기의 플라스미드 벡터의 표적세포는 간 세포인 것을 특징으로 한다.
- <40> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- <41> 본 발명은 간 세포에 적중하여 치료용 이중 유전자 (heterologous gene)를 발현시킬 수 있는 유전자 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다.
- <42> 본 발명에서 제공하는 간 적중 HBV벡터는 간염, 간 경변, 간암등의 간 질환 뿐 아니라, 가족성 고지혈증(familial hypercholesterolemia)등의 간 세포에 유전자 발현이 결핍되어 발생하는 대사성 유전병 치료에도 활용될 수 있다 (Kozarsky *et al.*, *Nat Genet* 13, 54-62.1996).
- <43> B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 DNA 바이러스로서 급성 간염 뿐 아니라, 만성 간염을 일으키는 임상적으로 매우 중요한 바이러스이다. 더군다나, 지속적인 만성 감염은 결국 간암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Buendia, 1992). HBV는 DNA 바이러스이지만 프리게노믹 RNA를 주형으로하여 HBV DNA 중합효소가 가지고 있는 역전사 활성(reverse transcriptase activity)을 통하여 DNA 유전자로 복제하는 매우 특이한 복제기전을 가지고 있는 바이러스이다(Ganem and Varmus, *Annu Rev Biochem* 56, 651-93.1987). 또한, HBV의 주요 특성의 하나는 간 세포(hepatocyte)에만 감염한다는 사실이다.
- <44> HBV는 약 3.2 k bp의 DNA 유전자를 갖고 있으며, 코아(C), 폴리머라제(P), 표면항원(S) 그리고 X 단백질의 네 개의 바이러스 단백질을 발현한다. DNA 유전자로부터 네 개의 RNA(3.5 kb, 2.5 kb, 2.1 kb, 0.7 kb)가 전사된다. 특히 3.5 kb RNA는 유전자 복

제의 주형으로 작용하므로 프리게노믹 RNA라고 불리운다. 또한, 이 RNA는 코아와 폴리머라제의 mRNA로도 작용한다. 나머지, 작은 RNA는 각각 표면항원(2.5 kb, 2.1 kb)와 X 단백질(0.7kb)의 mRNA로 작용한다. 프리게노믹 RNA는 코아와 폴리머라제의 mRNA로서 작용할 뿐 아니라 바이러스 유전자 복제의 주형으로도 작용한다. 이 프리게노믹 RNA는 3.2 kb의 DNA 게놈보다 약간 큰 3.5 kb 이다. HBV는 바이러스 복제를 위해 코아 단백질(core protein)과 프리게노믹 RNA를 인식하는 폴리머라제가 함께 코아 입자로 캡시드화된 후 이 코아 입자 안에서 폴리머라제에 의한 유전자 복제가 일어난다.

<45> 코아 입자안에 캡시드화된 프리게노믹 RNA를 주형으로하여 HBV의 DNA 폴리머라제가 역전사 과정으로 마이너스-가닥 DNA를 합성한다. 이 마이너스-가닥 DNA합성의 프라이머로는 매우 특이하게도 HBV DNA 폴리머라제가 이용된다. 즉, 단백질-프라이밍이 일어난다 (Wang and Seeger, 1992). 이 프라이밍 과정에서 5'에 존재하는 '엡실론' 이라고 불리는 약 80 염기쌍(base pairs)의 특이한 2차 구조의 염기서열이 HBV 마이너스-가닥 DNA합성의 개시부위(initiation site)로 작용한다 (Rieger and Nassal, 1996; Tavis *et al.*, 1994; Ryu, W. S., *J Virol* 66, 2310-5. 1993). 다음, 이 마이너스-가닥 DNA는 엡실론과 DR1(direct repeat) 사이의 4 염기쌍의 상동성(homology)를 이용하여 5'에서 3' DR1로 이동한다(Tavis, et al., 1994). 이 과정을 마이너스-가닥 전달이라고 부른다. 마이너스-가닥 DNA가 합성되면서 HBV 폴리머라제가 갖고있는 RNase H 활성에 의해 프리게노믹RNA는 5'-말단 캡 RNA만을 제외하고는 분해된다. 다음, 이 5'-말단 캡 RNA가 3' DR2로 전달된 후 프라이머로 작용하여 플러스-가닥 DNA를 합성한다(Loeb

et al., 1996). 이어서 주형 스위칭을 하여 원형 게놈을 만들게되며, 계속하여 플러스-가닥 DNA 합성을 계속한다. 이 플러스-가닥 DNA의 합성이 완결 되기 전에 HBV DNA는 바이러스 표면항원입자에 패키징되어 세포밖으로 나간다. 결국, HBV는 부분적인 이중 가닥 게놈을 갖게된다.

<46> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

<47> 구체적으로, 본 발명은 HBV와 동일한 외피부위를 보유하고 HBV 유전자의 일부만 치환함으로써 HBV의 숙주 세포 감염 기작은 그대로 나타내므로 HBV가 가진 간세포에 특이적으로 적중하는 특징을 나타낸다. 그러므로 유전자 치료 벡터가 가져야 할 목적 세포로의 특이적인 감염 특성이 있다. 또한, 바이러스 유전자의 HBV 폴리머라제 ORF부위의 일부를 제거하고 바이러스의 복제에 필요한 염기서열 중간에 이중의 GFP(*green fluorescent protein*) 유전자를 표식유전자(*reporter gene*)로 삽입함으로써 자체로는 바이러스 복제가 불가능하게 고안되어 야생형 유전자가 발생할 수 있는 위험성을 제거하였다. 하지만 바이러스 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 보유하고 있어 유전자 복제에 필요한 바이러스 단백질(즉, 코아 단백질과 HBV 폴리머라제)이 트랜스로 제공될 경우에는 보완현상(*complementation*)에 의하여 HBV 벡터유전자의 복제가 일어나 재조합 HBV 바이러스 입자가 생성된다 (Chiang *et al.*, 1990).

<48> 본 발명은 HBV의 기본적인 특성을 이용하고 유전자를 일부 변형하여 만든 것이다. 우선, 유전자 치료 벡터를 만들기 위해 고려해야 할 사항은 다음과 같다 (Friedmann, 1999).

<49> 첫째, 유전자 치료 벡터는 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 반드시 포함하고 있어야 한다.

<50> 우선, HBV 유전자복제의 주형인 프리게노믹(pregenomic)RNA의 캡시드화(encapsidation)에 필요한 캡시드신호(encapsidation signal)로 엡실론(epsilon)이라는 약 80bp의 염기서열을 필요로 한다(Junker-Niepmann *et al.*, 1990). 이러한 염기 서열을 특정 위치에 보유한 RNA는 이중의 유전자라도 HBV의 코아 단백질 및 폴리머라제에 의해 코아 입자로의 캡시드화된다. 다음으로, 캡시드화된 코아 입자 내에서의 유전자 복제에 작용하는 시스-엘리먼트이다 (Havert and Loeb, 1997). 이러한 시스-엘리먼트들은 바이러스 코아 입자로의 캡시드화에는 영향을 미치지 않으나 이후 바이러스 폴리머라제에 의한 유전자 복제에 필수적이다. 즉, 코아 입자로 캡시드화된 프리게노믹 RNA로부터 마이너스-가닥 DNA가 만들어지지 않거나, 새로 만들어진 마이너스-가닥 DNA로부터 플러스-가닥 DNA의 합성이 일어나지 않는다.

<51> 유전자 치료 벡터는 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 반드시 포함하고 있어야 한다 (Smith, 1995). Hepadnavirus중에서 DHBV(Duck hepatitis B virus)는 복제에 필요한 시스-엘리먼트가 규명되었지만 (Havert and Loeb, 1997) 불행히도, HBV는 아직 복제에 필요한 시스-엘리먼트가 규명되지 않았다. 본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 규명한 후 이를 보존한 재조합 HBV벡터를 설계하였다.

<52> 실시예에서도 밝히겠지만 본 발명에서 제공하는 HBV벡터의 타당성을 Huh7세포 (Nakabayashi *et al.*, 1982)라는 간암 세포주의 트랜스팩션 실험을 통해 실시하였다. 본 발명에서 제공하는 HBV벡터에는 복제에 필요한 바이러스의 코아 단백질 및 폴리머라제를 다른 플라스미드를 통하여 제공하였다 (Chiang, et al., 1990; Nassal *et al.*, 1990). 삽입되는 이중 유전자의 발현은 HBV유전자의 프리(pre)-S2프로모터를 이용하였다. 프리-S2 프로모터는 HBV의 표면 항체의 전사체의 프로모터이다. 야생 HBV의 복제

기작과 동일한 기작을 통해 삽입 유전자를 발현 시키기 위해 이를 적용하였다.

<53> 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<54> 단, 다음의 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 다음의 실시예가 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

<55> 실시예 1: 야생형 HBV발현 벡터(R015; pCMV-HBV/30)의 제조

<56> HBV 발현 유전자 벡터를 설계하려면 HBV의 유전자 복제에 필수적인 염기서열부위(시스-엘리먼트)가 완전히 규명되어야 한다. 이러한 복제에 필요한 염기서열부위를 규명하기 위하여 세포에 트랜스팩션하였을 때 야생형HBV를 생성하는 HBV 프리게노믹 RNA발현 벡터를 제조하였다 (도면 2a).

<57> CMV(cytomegalovirus) 프로모터에 의해 HBV 프리게노믹(pregenomic) RNA와 동일한 구조 및 염기 서열의 mRNA가 전사되면 HBV의 복제 기작과 동일한 과정을 통해 바이러스 입자를 만들 수 있다는 것은 공지의 사실이다 (Nassal, et al., 1990; Will *et al.*, 1987).

<58> 1-1. HBV를 발현하는 플라스미드 제조 시 고려 사항

<59> HBV를 발현하는 플라스미드를 제조하기 위해 우선적으로 고려해야 할 사항은 바로 전사되는 mRNA가 HBV 프리게노믹 RNA와 동일하도록 만드는 것이다(Will, et al., 1987). 이후, 전사된 mRNA로부터 복제에 필요한 바이러스의 단백질이 만들어지고 바이러스 유전자의 복제 및 바이러스 입자가 생산된다. 특히 엡실론(e)이라는 캡시드화(encapsidation) 신호는 바이러스의 복제의 첫 단계에서 캡시드화에 필수적인 중요한 인자이다. 이 엡실론 신호는 프리게노믹 RNA의 5'-말단으로부터 약 30 뉴클레오타이드

(nucleotide) 떨어져 있다 (Junker-Niepmann, et al., 1990). 본 발명에서는 아래의 실시예와 같이 HBV 프리게노믹 RNA 발현 벡터를 제조하였다.

<60> 1-2. R402플라스미드(pCMV-HBV/164)의 제조

<61> CMV 프로모터로부터 숙주세포의 RNA 폴리머라제(polymerase) II에 의해 전사가 일어나는 pcDNA1/Amp (Invitrogen, USA)의 클로닝 사이트에 있는 *EcoRV*와 *XbaI*의 제한효소 인식 부위 사이에 HBV 전체 유전자보다 172뉴클레오타이드가 더 겹치는 길이의 HBV ayw 서브타입(subtype) 유전자 (Galibert et al., 1979)를 *FspI*과 *XbaI*으로 잘라서 삽입하였다(도면 2a참조). 이는 HBV의 복제 기작에서 환상(circular)의 HBV유전자 중 특정 부위가 중복되어 전사가 일어나서 5'-말단과 3'-말단이 동일한 염기서열 및 구조를 가지기 때문에 선상(linear)의 플라스미드 전사에서 이를 보전하기 위함이다 (Ganem and Varmus, 1987). 이러한 HBV유전자 절편을 *FspI*과 *XbaI*으로 자를 때 동일한 제한효소 인식 부위가 두 군데 이상 존재하므로 부분적 절단을 통해 정확한 크기의 HBV유전자 절편을 준비하였다. 벡터로 사용한 pcDNA1/Amp를 *EcoRV*와 *XbaI*으로 자르고 HBV 유전자 절편과 서로 T4 DNA 라이게이즈(ligase)를 통해 연결하였다. 이로써 만들어진 R402(pCMV-HBV/164)는 야생형 HBV와는 달리 5'-말단으로부터 엡실론 신호가 164 뉴클레오타이드 떨어져 있는 mRNA로 전사된다. 이는 야생형에 비하여 엡실론의 위치가 5'-말단으로부터 134 뉴클레오타이드가 더 멀리 떨어진 것이다. 이러한 결과는 pcDNA1/Amp의 전사가 시작되는 지점이 클로닝 사이트보다 상부(upstream)에 위치하기 때문이다.

<62> 1-3. 야생형 HBV 프리게노믹 RNA를 발현하는 R015 플라스미드(pCMV-HBV/30) 제조

<63> 야생형 HBV 프리게노믹 RNA와 같은 염기 서열 및 구조를 지닌 mRNA를 전사하도록

만들기 위해 실시예 1-2에서 만든 플라스미드의 5'-말단 염기를 제거하려 하였다. 도면 2a에서와 같이 플라스미드R402(pCMV-HBV/164)를 *SacI*과 *BspEI*으로 자르고, 동일한 제한효소 인식 부위를 양끝에 보유한 HBV유전자 절편을 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭하였다. 이때 인위적인 제한 효소 인식 부위를 삽입하고 플라스미드R402의 전사 시작 부위에 HBV 프리게노믹 RNA시작 부위가 정확하게 일치하도록 프라이머 (HBV1820)를 제작하였다(도면 2b 참조). 사용한 프라이머 염기 서열은 다음과 같다.

<64> HBV1820 ;

<65> 5-CCCAGCTCTCTGGCTAACTAACTTTTTTCACCTCTGCC-3

<66> *SacI* HBV 염기 서열(nt 1820-1837)

<67> HBV2839-2822 ;

<68> 5-CCCAAGCTTCTATTGTTCCCAAGAATATGG-3

<69> 이들 프라이머와 플라스미드 R402를 주형(template)으로 하여 만들어진 PCR 산물을 다시 *SacI*과 *BspEI*으로 잘라서 플라스미드R402에 삽입하였다. 최종적으로 만들어진 플라스미드 R015(pCMV-HBV/30)를 세포에 트랜스펙션(transfection)하면 세포 내에서 HBV 프리게노믹 RNA의 캡시드화되고 유전자 복제가 일어남을 확인하였다 (실시예 2, 실시예 4, 실시예 7 참조). 전사되는 mRNA의 첫 번째 염기 서열을 1번으로 한 전체 염기서열은 도면 9(혹은 염기서열 1)과 같다.

<70> 실시예 2: R015 플라스미드(pCMV-HBV/30)에서 전사되는 프리게노믹 RNA 캡시드화

<71> 앞에서 기술한 바와 같이 B형 간염 바이러스의 복제를 위해서는 먼저 바이러스의

RNA가 코아 입자로 캡시드화되는 것이 가장 중요하다. 따라서 실시예 1에서 제작한 플라스미드R015(pCMV-HBV/30)에서 전사되는 프리게노믹 RNA가 캡시드화되는지의 여부를 확인하고자 하였다. 또한 DNA 복제 여부는 실시예 4 및 실시예 7을 통해 확인하였다.

<72> 2-1. HBV유전자가 삽입된 플라스미드를 세포에 트랜스팩션 했을 때 HBV RNA의 캡시드화 조사

<73> 실시예 1-2와 1-3을 통해 만든 플라스미드를 Huh7 세포에 트랜스팩션하여 실제로 HBV RNA의 캡시드화 기작을 수행하는가를 RPA(RNase Protection Assay)를 통해 알아보았다. 앞에서 밝혔듯이 복제 기작의 첫 단계가 HBV 프리게노믹 RNA가 코아 단백질 및 HBV 폴리머레이즈(polymerase)와 함께 코아 입자로 캡시드화되는 것이므로 세포로부터 코아 입자를 수득하여 코아 입자 내의 HBV RNA존재여부를 측정하였다(도면 3a 참조).

<74> 2-2. Huh7 세포에 플라스미드 트랜스팩션

<75> 실시예 1-2와 1-3을 통해 만든 플라스미드를 칼슘 트랜스팩션(calcium transfection)의 방법(Ryu *et al.*, 1992)으로 간 세포에서 유래한 Huh7 세포에 트랜스팩션하였다. 자세히 설명하면, Huh7 세포를 75%로 60mm 플레이트에 배양한 다음날에 상기 플라스미드 10mg을 0.25M CaCl_2 가 포함된 250ml의 물에 섞은 다음, 동량의 2X HEPES 완충용액[280 mM NaCl, 50 mM HEPES acid, 1.5 mM Na_2HPO_4 (pH 7.1)]에 흔들면서 한 방울씩 떨어뜨려 혼합물을 만든다. 이후 이 혼합물을 상온에서 30분간 반응시켜 하얀 침전물이 생기도록 한 다음 플레이트에 골고루 뿌려준다. 16시간 후 새로운 배양액[DMEM, 10% Fetal bovine serum, 10mg/ml Gentamycin]으로 갈아주고, 3일 후 바이러스 코아 입자를 수확하였다.

- <76> 2-3. 트랜스팩션에 사용된 플라스미드 유전자 지도
- <77> 실시예 1-2와 1-3에서 만든 플라스미드 외에도 pCH3142 플라스미드와 pCH9/3091 플라스미드의 네 가지의 유전자 지도를 도면 3b에 나타내었다. pCH3142 플라스미드는 캡시드화 신호가 제거되어 있어 바이러스 복제가 불가능하며 복제에 필요한 바이러스 단백질 산물을 제공한다(Nassal, et al., 1990). pCH9/3091 플라스미드는 야생형 HBV 바이러스가 발현되게 만든 플라스미드이므로 양성 대조군으로 사용할 수 있다(Nassal, et al., 1990).
- <78> 2-4. 세포 내 전체 RNA 추출과 캡시드화된 코아입자 수확 및 RNA 추출
- <79> 세포 내 전체 RNA는 Huh7 세포를 인산완충액(phosphate buffer saline)으로 두 번 씻은 다음 구아니딘 아이소시아네이트(guanidinium isothiocyanate) 용액으로 세포를 깨서 페놀과 클로로포름 처리하여 단백질을 제거하고 에탄올로 RNA를 침전시켜 분리하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987).
- <80> 코아 입자 수확 및 코아 내 RNA 추출은 먼저 인산완충액으로 Huh7 세포를 두 번 씻고 분해 용액[lysis buffer; 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 50mM NaCl]로 세포를 배양 플레이트로부터 떼어낸다. 이후 DNase I (Sigma, USA) 및 S7 Nuclease (Calbiochem, USA) 처리를 한 후 4X PNE [26% PEG, 1.4M NaCl, 40mM EDTA]로 0 °C에서 한 시간 동안 처리하고 원심분리를 하여 코아 입자만을 분리해 내었다. 이후 수확한 코아 입자로부터의 RNA 추출은 세포 내 전체 RNA 추출 때와 같은 방법으로 분리하였다.
- <81> 2-5. RPA(RNase Protection Assay)를 이용한 HBV RNA의 캡시드화 분석
- <82> 실시예 2-3과 같이 코아 입자 내에서 추출된 HBV RNA는 Huh7 세포 내에서 트랜스팩

션한 플라스미드에 의해 HBV 프리게노믹 RNA가 전사되고 캡시드화되어 복제 기작을 수행할 수 있음을 의미한다. 이처럼 추출한 전체 및 코아 입자 내 RNA는 1×10^5 cpm의 [α - 32 P]UTP (3,000Ci/mmol, Amersham)로 표지된 HBV 프루브(probe)를 이용하여 42°C에서 16시간동안 하이브리드 형성(hybridization)시킨 후 RNaseA/T1 혼합액(Ambion, USA)으로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후 5 % 아크릴아미드(acrylamide)/8M 우레아(urea) 겔에서 분리하였다. 그리고 16시간동안 -70°C에서 X-ray 필름에 노출시킨 다음 현상하였다.

<83> 2-6. 캡시드화의 분석결과

<84> RPA(RNase Protection Assay) 결과, 예상대로 대조군인 pCH9/3091플라스미드를 Huh7에 트랜스팩션한 경우, 세포 내 전체 RNA(도 3c 라인 4) 및 코아 입자 내의 RNA(도 3c 라인 3)에서 HBV 유전자가 검색되었고, pCH3142플라스미드의 경우, 세포 내 전체 RNA(도 3c 라인 6)에서는 HBV 유전자가 검색되었으나 코아 입자 내 RNA(도 3c 라인 5)는 검색되지 않았다. 실시예 1-2에서 만든 R402(pCMV-HBV/164) 플라스미드로 트랜스팩션한 경우, 캡시드화 신호의 위치가 바뀌어 세포 내 전체 RNA(도 3c 라인 10)에서는 HBV 유전자가 검색되었으나 코아입자 내 RNA(도 3c 라인 9)는 검색되지 않았다. 본 발명에서 제공하는 R015(pCMV-HBV/30)의 경우, 세포 내 전체 RNA(도 3c 라인 8) 및 코아 입자 내 RNA(도 3c 라인 7)가 HBV 프루브에 의해 검색되었다. 이로서, R015플라스미드에서 전사되는 프리게노믹 RNA가 캡시드화됨을 확인하였다.

<85> 실시예3: HBV 결손 변이체의 제조

<86> 상기 실시예 1-3에서 제조한 R015(pCMV-HBV/30) 플라스미드를 이용하여 다음과 같

은 결손 변이체(deletion mutant)를 제조하였다 (도 4 참조). 결손 변이체 플라스미드의 결손 부위를 나타내는 각 염기 번호는 HBV ayw 서브타입(subtype)의 염기 서열을 HBV 내의 제한효소 *EcoRI* 위치를 1번으로 하여 3182번까지 표기한 것이다(Galibert, et al., 1979). 본 발명자들이 실시예 1에서 만든 R015(pCMV-HBV/30)는 이러한 HBV염기 중 1820을 1번으로 하여 염기 서열을 정한 것이다.

<87> 3-1. R020(pCMV- ayw Δ 1884-2459)의 제조:

<88> HBV유전자(Galibert, et al., 1979)의 *Sac* I, *Xho* I 사이의 절편을 pBluescript SK(-) 플라스미드 (Stratagene, USA)의 *Sac* I, *Xho* I 자리로 옮긴 후 *Sty* I으로 잘라서 라이게이션(ligation)하여 575 nt.가 소거된 R017 플라스미드(pBS- Δ 1884-2459)를 제조하였다. R017플라스미드의 *Sac* I, *Xho* I 사이의 절편을 R015플라스미드의 *Sac* I, *Xho* I 자리로 옮겨 R020플라스미드를 만들었다.

<89> 3-2. R021(pCMV-ayw Δ 2459-2817)의 제조:

<90> HBV유전자의 *Sac* I, *Xho* I 사이의 절편을 pBlueBacHis2 플라스미드(Invitrogen, USA)의 *Sac* I, *Xho* I 자리로 옮긴 후 *Sty* I, *BstE* II로 잘라서 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 2459-2817을 소거시킨 R018플라스미드 (pBBH- Δ 2459-2817)를 만들었다. R018플라스미드로부터 *BspE* I, *EcoR* I사이의 절편을 R015의 *BspE* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R021플라스미드를 만들었다.

<91> 3-3. R022(pCMV-ayw Δ 2662-3182/0)의 제조:

<92> R015를 *BstE* II와 *EcoR* I으로 잘라서 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 2662-3182를 소거시킨 R022플라스미드를 만들었다.

- <93> 3-4. R044(pCMV-ayw Δ 3052-3182/0)의 제조:
- <94> R015플라스미드를 *Bst*E II로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 *Sph*I로 자른 절편을, pGEM4Z플라스미드의 *Eco*R I로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 *Sph*I로 자른 절편 사이에 삽입하여 R701플라스미드를 만들었다. R701플라스미드를 *Bsu*36 I과 *Eco*R I으로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt.3052-3182을 소거시킨 R042플라스미드를 만든 다음 R042플라스미드를 *Bst*X I으로 자른 절편을 R015플라스미드의 *Bst*X I 사이로 옮겨 R044플라스미드를 만들었다.
- <95> 3-5. R045(pCMV-ayw Δ 2839-3182/0)의 제조:
- <96> 실시예 3-4의 R701플라스미드를 *Bgl*I II와 *Eco*R I 으로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt.2839 -3182을 소거시킨 R043플라스미드를 만든 다음 R043플라스미드를 *Bst*X I으로 자른 절편을 R015플라스미드의 *Bst*X I 사이로 옮겨 R045플라스미드를 만들었다.
- <97> 3-6. R023(pCMV-ayw Δ 3182/0-129)의 제조:
- <98> R015플라스미드를 *Eco*R I과 *Xho* I으로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt.3182/0-129를 소거한 R023플라스미드를 만들었다.
- <99> 3-7. R040(pCMV-ayw Δ 129-490)의 제조:
- <100> HBV유전자의 *Eco*R I, *Sph* I 사이의 절편을 pGEM4Z플라스미드에 삽입하여 R037플라스미드를 만들었다. R037플라스미드를 *Xho* I, *Bam*HI I으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 129-490을 소거한 R038플라스미드 (pGEM4Z- Δ 129-490)를 만들었다. R038플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I사이의 절편을 R015의 *Eco*R I, *Sph* I 자리로

옮겨 R040플라스미드를 만들었다.

- <101> 3-8. R041(pCMV-ayw Δ 490-827)의 제조:
- <102> 실시예 3-9에서 만든 R037플라스미드를 *Bam*H I, *Acc* I 으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 490-827을 소거한 R039플라스미드 (pGEM4Z- Δ 490-827)을 만들었다. R039플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I사이의 절편을 R015플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 자리로 옮겨 R041플라스미드를 만들었다.
- <103> 3-9. R025(pCMV-ayw Δ 827-1238)의 제조:
- <104> R003플라스미드를 *Acc* I, *Sph* I으로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제(polymerase)로 채우고 라이게이션하여 nt. 827-1238을 소거한 R008플라스미드(pBS- Δ 827-1238)를 만들었다. R008플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 절편을 R015플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 자리로 옮겨 R025플라스미드를 만들었다.
- <105> 3-10. R026(pCMV-ayw Δ 1238-1374)의 제조:
- <106> R003플라스미드를 *Sph* I, *Nco* I으로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채우고 라이게이션하여 nt. 1238-1374를 소거한 R009플라스미드 (pBS- Δ 1238-1374)를 만들었다. R009플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 절편을 R015플라스미드의 *Eco*R I, *Apa* I 자리로 옮겨 R026플라스미드를 만들었다.
- <107> 3-11. R027(pCMV-ayw Δ 1374-1419)의 제조:
- <108> R003 플라스미드를

Nco I, *Aat* II로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채운 후 라이게이션하여 nt. 1374-1419를 소거한 R012플라스미드 (pBS- Δ 1374-1419)를 만들었다. R012플라스미드의 *EcoR* I, *Apa* I 절편을 R015플라스미드의 *EcoR* I, *Apa* I 자리로 옮겨 R027플라스미드를 만들었다.

<109> 3-12. R028(pCMV-ayw Δ 1419-1804)의 제조:

<110> R003플라스미드를 *Aat* II로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채운 후 *Apa* I으로 잘라서 얻은 절편과 R003플라스미드를 *Apa* I, *Fsp* I으로 잘라서 얻은 절편을 라이게이션하여 nt. 1419-1804가 소거된 R013플라스미드(pBS- Δ 1419-1804)를 만들었다. R013플라스미드의 *EcoR* I, *Apa* I 절편을 R015플라스미드의 *EcoR* I, *Apa* I 자리로 옮겨 R028플라스미드를 만들었다.

<111> 3-13. R029(pCMV- ayw Δ 1804-1884)의 제조:

<112> R003플라스미드를 *Sty* I으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 *EcoR* I으로 잘라서 얻은 3.0 kb 절편과 R003플라스미드를 *EcoR* I, *Fsp* I으로 잘라서 얻은 1.8 kb 절편을 라이게이션하여 nt. 1804-1884가 소거된 R010플라스미드 (pBS- Δ 1804-1884)를 만들었다. R010플라스미드의 *EcoR* I, *Apa* I 절편을 R015플라스미드의 *EcoR* I, *Apa* I 자리로 옮겨 R029플라스미드를 만들었다.

<113> 3-14. R035(pCMV- ayw Δ 1607-1804)의 제조:

<114> R003플라스미드를 *Bsa* I으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 *EcoR* I으로 잘라서 얻은 1.6 kb 절편과 R015를 *EcoR* I으로 자른 후 *Fsp* I으로 부분적으로 잘라서 얻은 6.2 kb 절편을 라이게이션하여 R035플라스미드를 만들었다.

<115> 실시예 4. 씨던 블릿을 통한 시스-엘리먼트의 분석

- <116> 4-1. 코아 입자로부터 HBV DNA 추출 및 써던 블럿
- <117> 트랜스팩션 3일 후, 먼저 인산완충용액(phosphate buffered saline)으로 세포를 두 번 씻고 라이시스 버퍼[10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 50mM NaCl]로 세포를 플레이트로부터 떼어낸다. 남아있는 트랜스팩션한 플라스미드를 제거하기 위해 DNase I 처리를 한 후 4 X PNE [26% PEG, 1.4M NaCl, 40mM EDTA]로 0 °C에서 한 시간 동안 처리하고 원심분리를 하여 코아 입자만을 분리해 내었다. 수득한 코아 입자 단백질을 분해하기 위해 Pronase로 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 페놀과 클로로포름으로 단백질을 제거하고 에탄올로 코아 입자내의 DNA를 추출하여 써던블럿을 하였다. 먼저 각각의 추출된 DNA를 1.25% 아가로스젤을 통해 전기 영동하고, 알칼리 변성용액[0.5N NaOH, 1.5M NaCl]으로 DNA를 변성시킨 다음, 중화완충액[0.5M Tris-Cl, 1.5M NaCl]을 처리를 하고 나일론 멤브레인에 DNA를 이동시켰다. UV-크로스 링킹 후, HBV 및 GFP 프루브를 이용하여 65°C에서 하루동안 하이브리드 형성(hybridization)시켰다. 하룻동안 70°C에서 필름에 노출시킨 후 현상하였다.
- <118> 4-2. 시스-엘리먼트 분석
- <119> 실시예 3에서 HBV복제에 필요한 시스- 엘리먼트를 규명하고자 제한효소 자리를 이용하여 15개의 결손변이체를 제조하였다 (도 4 참조). 이들 변이체는 각각 약 0.1-0.7 kb의 조각의 소거로 모두 합하면 HBV 전체 게놈을 포함한다. 이들 변이체 DNA를 각각 헬퍼(helper) 플라스미드 (pCH3142 : P+, C+, -) (Nassal, et al., 1990)와 함께 Huh7 세포에 실시예2-2와 같은 방법으로 트랜스팩션시키고 3일 후에 코아 입자로부터 DNA를 추출하여 써던 블럿(Southern blot)으로 HBV 유전자 복제를 분석하였다(도 5a 참조). HBV 유전자 복제 기전에서 설명하였듯이 코아입자에 존재하는 HBV 유전자 복제의 중간체

는 SS(단일-가닥 DNA), DL(이중-가닥 DNA), RC(relaxed circular DNA, 릴렉스드 환형) 형태로 존재한다 (도 1c). 이중에서 RC 형태의 DNA가 바이러스 입자에 존재하는 HBV 게놈 복제의 최종 산물이므로 RC 형태 DNA의 존재여부로 각 결손변이체에 결손된 염기서열이 복제에 필요한 시스-엘리먼트 인지 판단할 수 있다.

<120> R022플라스미드 (pCMV- ayw Δ 2662-3182/0)를 트랜스팩션한 경우 RC DNA는 검출되지 않았고 SS DNA만이 검출되었다. 이 부위를 좀더 세분하게 규명하기 위하여 R022플라스미드를 R045플라스미드 (pCMV- ayw Δ 2839-3182/0)과 R044플라스미드 (pCMV- ayw Δ 3052-3182/0)로 구분한 뒤 써던 블랏을 수행하였다. 그 결과, R044는 SS DNA, DL DNA 뿐 아니라 RC DNA가 검출되었으므로 R044의 결손부위는 복제에 불 필요함을 알 수 있었다. 반면에, R045는 적은량의 SS DNA만이 검출되었으므로 R045의 결손부위 (nt.2839-3182)가 복제에 필요한 부위를 포함하고있음을 알 수 있었다. 이 두가지 결손변이체의 결과로부터 (nt. 2662-3052)가 새로운 시스-엘리먼트임을 알 수 있었다. 본 발명에서 이 부위를 알파부위(α)로 명명하였다.

<121> 한편, R027플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1374-1419)는 RC DNA는 검출되지 않았고 SS DNA만이 검출되었다. 이 결과로부터, nt. 1374-1419를 포함한 부위가 HBV 유전자 합성에 필요한 새로운 시스-엘리먼트가 밝혀졌다. 본 발명에서 이 부위를 베타부위(β)로 명명하였다 (도 5b 참조).

<122> R028플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1419-1804)은 DR2(nt.1592-1602)가 결손된 경우로서 릴렉스드(relaxed) 환형(circular) DNA가 나타나지 않고, 단일 가닥 DNA만이 감지되었다 (도 5b 참조). DHBV에서도 DR2가 마이너스-DNA 합성에 영향을 준다고 보고되었다 (Loeb, et al., 1996).

<123> R029플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1804-1884)는 DR1(nt.1826-1836)이 결손된 경우로서 마이너스-가닥 DNA합성이 일어날 수 없기 때문에 이후에 진행되는 모든 복제과정이 일어나지 않아서 DNA가 감지되지 않았다 (도 5b 참조). 두개의 결손 변이체의 분석으로부터 DR2와 DR1이 복제과정에 필요한 것임을 확인하였다.

<124> R035플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1607-1804)는 DR1와 DR2사이가 결손된 변이체로 DNA 합성이 전혀 일어나지 않았다 (도 5b 참조). 마이너스-가닥 DNA 합성의 개시 부위 (initiation 자리)인 DR1이 존재하지만, 복제가 일어나지 않으므로 DR1과 DR2사이의 염기서열은 복제에 필요하다고 추정된다. 즉, 이 부분은 마이너스-가닥 DNA합성에 필요하다. DHBV에서도 DR2와 DR1사이가 마이너스-DNA 합성에 영향을 준다고 보고되었다 (Loeb, et al., 1996). 이 부분은 새로운 시스-엘리먼트이므로 감마부위(γ)로 명명하였다.

<125> 이러한 써던 블롯의 결과에 대한 이해로 이중 유전자의 삽입 부위를 결정할 수 있었다.

<126> 한편, HBV 유전자의 일부는 HBV 유전자 복제에 불필요한 것으로 밝혀졌다 (도 5b 참조). 결손되어도 릴렉스드 환형 DNA를 형성할 수 있는 것으로 나타난 R021(pCMV- ayw Δ 2459-2817), R023(pCMV- ayw Δ 3182/0-129), R040(pCMV- ayw Δ 129-490), R041(pCMV- ayw Δ 490-827), R025(pCMV- ayw Δ 827-1238), R026(pCMV- ayw Δ 1238-1374)의 경우 전체적인 릴렉스드 환형 DNA합성의 효율이 낮게 나타났지만 각 유전자 밴드(band)들의 상대적인 비율은 야생형인 R015와 비슷한 수준으로 나타났다 (도 5b 참조).

<127> 실시예 5: HBV백터 설계

<128> 본 발명의 실시예 4에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 새로운 시스-엘리먼트들을 모두 규명하였다. 이들은 HBV 유전자 복제에 필요한 것으로 이미 알려진 DR1, DR2, 엡실론 이외의 새로운 시스-엘리먼트들이다 (Condreay *et al.*, 1992; Nassal and Schaller, 1996; Seeger *et al.*, 1991). HBV 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트들을 규명함으로써 재조합 HBV-GFP 유전자 벡터에 필요한 정보를 제공하였다. 이들을 프리게노믹 RNA의 5-말단으로부터 각각 알파, 베타, 감마로 명명하였다(도 6 참조): 알파부위 (nt. 2662-3052), 베타부위 (nt. 1374-1419), 감마부위 (nt. 1607-1804). 이들은 DHBV(duck hepatitis B virus)에서 밝혀진 새로운 시스-엘리먼트들과 유사성 및 차이점을 보였다 (Havert and Loeb, 1997). 구체적으로, 엘리먼트 (nt. 1607-1804)은 DR2와 DR1사이의 부분으로 환형화(circularization)에 필요한 r(terminal redundancy) 염기서열을 포함하고있기 때문에 RC (relaxed circular) DNA형성은 일어나지 않았다.

<129> 본 발명의 실시예 4의 결과, HBV 유전자에서 1504뉴클레오타이드의 결손가능부위 (dispensable region ; nt. 3052-1374)를 규명하여 HBV를 유전자 치료벡터로 개발할 수 있는 초석을 제공하였다.

<130> 실시예 6: 외부유전자가 삽입된 HBV vector의 제조

<131> 실시예5에서 설계된 HBV벡터의 결손가능부위에 외부 유전자를 삽입하여 그 복제를 조사하였다. 바이러스의 복제에 필수적인 시스-엘리먼트는 보존하고 결손가능부위를 일부 소거한 후 여기에 이종(heterologous)의 유전자를 삽입함으로써 HBV유전자보다 큰 유전자의 복제 가능성도 알아보았다.

<132> 6-1. GFP(green fluorescent protein) 유전자의 HBV벡터로의 삽입

<133> 실시예 1에서 제공한 HBV 벡터에 HBV 유전자가 일부 결손되고(nt. 3166-3182) 외부 유전자가 삽입된 재조합 HBV벡터의 복제를 알아보기 위해 HBV 벡터에 약 0.7kb의 GFP(green fluorescent protein) 유전자를 외부 유전자로 삽입하였다(도 7a 참조). 이때 GFP PCR 산물의 양끝에는 프라이머를 통해 만들어진 제한효소 인식 부위가 생성되므로 이를 이용하여 R703(pCMV-HBV/ Δ PS₂GFP) 플라스미드를 제조하였다(도 7b 참조). 이 과정에서 이용되는 제한효소 인식부위가 HBV 벡터의 두 곳에 위치하여 pre-S2 프로모터가 일부 포함된 HBV유전자 절편이 결손되므로 이 부위를 재 삽입하여 R704(pCMV-HBV/GFP) 플라스미드를 제조하였다 (도 7a 참조).

<134> 6-2. 삽입부위의 선택

<135> 본 발명에서는 HBV ayw 계통의 nt 3166(*Bsu*36I)-3182(*Eco*RI)에 이중 유전자를 삽입하였다(도 7c 참조). 그 선정이유는 첫째, 이 부위는 결손가능부위이며, 둘째 HBV의 pre-S2 프로모터 (HBV계통의 pre- S2 promoter)를 이용함으로써, 삽입되는 치료용 유전자가 자체적으로 발현하기 때문이다.

<136> 6-3. GFP유전자를 삽입한 R703(pCMV-HBV/ Δ PS₂GFP) 플라스미드 제조

<137> 외래 유전자 대용으로 GFP(green fluorescent protein)를 삽입하기 용이하도록 *Bsu*36I과 *Eco*RI의 제한효소 인식 부위를 프라이머를 이용하여 첨가하고 PCR을 통해 GFP 유전자 절편을 만들어 삽입하였다(그림 7a 참조). 구체적으로, 프라이머 GFPBsuF의 5' 말단으로부터 클로닝을 위한 *Bsu*36I의 제한효소 인식부위를, 그리고 프라이머 GFPEcoR의 5'말단에 *Eco*RI의 제한효소 인식부위를 넣어서 PCR에 이용하였다 (도 7b 참조). 구체적인 염기 서열은 다음과 같다.

<138> GFPBsuF ;

<139> 5-GTCACTCCTCAGGAGATGAGTAAAGGAGAAG -3

<140> *Bsu36I*

<141> GFPEcoR ;

<142> 5-GGAATTCGTTTCATCCATGCCATGTG -3

<143> *EcoRI*

<144> 벡터는 플라스미드 R015(pCMV-HBV/30)를 *Bsu36I*과 *EcoRI*으로 동시에 잘라서 만들어지는 7.8kb의 유전자 절편을 사용하고, 삽입하는 외래 유전자 절편은 PCR산물로부터 역시 *Bsu36I*과 *EcoRI*으로 동시에 자른 678염기쌍의 유전자 절편을 이용하였다. 상기 두 유전자 절편을 라이게이션하여 R703(pCMV-HBV/ \angle P_{S2}GFP) 플라스미드를 제조하였다.

<145> 6-4. GFP 삽입 HBV 유전자 벡터 R704(pCMV-HBV/GFP)의 제조

<146> 상기 실시예 6-3의 유전자 벡터를 제조하면서 결손된 pre-S2 프로모터 부위를 복구하기 위해, *Bsu36I* 제한효소로 잘라서 결손된 HBV 유전자 절편(nt. 3052-3166)을 삽입하였다(도 7a 참조). 그러나 양쪽의 제한효소 절단 부위가 동일하므로 올바른 방향으로 삽입된 플라스미드를 선택하기 위해 삽입된 유전자 절편에 상보적인 프라이머를 제조하여 PCR로 확인하였다. 이때 사용된 프라이머 염기 서열은 다음과 같다.

<147> HBV3117-34 ;

<148> 5-TCAGGAAGGCAGCCTACC -3

<149> HBV310-291 ;

<150> 5-TTGGCCAAGACACACGGTAG -3

- <151> 이후 염기 서열을 통해 이를 재확인 하였다(도 10 혹은 염기 서열 2 참조).
- <152> 실시예 7: 재조합 HBV유전자 벡터 R704(pCMV-HBV/GFP)의 복제 확인
- <153> 상기 재조합 벡터를 HBV 유전자 치료 벡터로서의 유용성 확인을 위해 써던블롯(southern blot)을 통해 복제 여부를 확인하였다.
- <154> 7-1. GFP 발현 HBV 벡터의 Huh7세포로의 트랜스팩션 및 써던 블롯
- <155> 실시예 6-4에서 만든 GFP 삽입 HBV 유전자 벡터와 pCH3142를 실시예 2-2와 같은 방법으로 Huh7 세포에 동시에 트랜스팩션하였다 (도 8a 참조) (Ryu, et al., 1992). 16시간 후 새로운 배양액[DMEM, 10% Fetal bovine serum, 10 mg/ml Gentamycin]으로 교체하고, 3일 후 바이러스 코아 입자를 수득하였다. 이후 실시예 4-2와 같이 써던 블롯하였다.
- <156> 7-2. 써던 블롯 결과
- <157> 실시예7-1 에서 수득한 DNA를 써던 블롯한 결과는 도 8a와 도 8b에 나타나 있다. 두 개의 웰에서 각기 동량의 유전자를 전기영동한 후, 나일론 멤브레인에 이동시키고 이를 각각 HBV 프루브(probe) 및 GFP 프루브로 하이브리드 형성(hybridization)시켰다. 본 실험에서는 HBV를 생산하는 간암세포주인 HepG2.2.15세포에의 코아입자에서 추출한 DNA를 비교 분석하였다 (Sells *et al.*, 1988). 도 8a에서 HBV 프루브로 하이브리드 형성한 경우 세 종류의 경우에서 모두 HBV 유전자가 검색되었는데 예상한 대로 R704 플라스미드로 트랜스팩션한 세포에서도 야생의 HBV와 같은 형태의 유전자 밴드가 나타남을 알 수 있다. 도 8b에서 GFP 프루브로 하이브리드 형성시킨 경우 플라스미드 R015(pCMV-HBV/30)를 트랜스팩션한 경우와 HepG2.2.15는 유전자가 검색되지 않았으나 플

라스미드 R704(pCMV-HBV/GFP)로 트랜스팩션한 Huh7세포 추출물에서만 유전자가 검색되었다. 결론적으로, 본 발명이 제공하는 원형의 HBV백터는 이중 유전자를 삽입하여도 복제능(replication competent)에 손상이 없으므로 유용한 유전자 치료백터로의 가능성이 입증되었다.

【발명의 효과】

- <158> 이상에서 상세히 기술하였듯이, 본 발명의 재조합 B형 간염 바이러스 백터는 다음과 같은 특징을 갖는다.
- <159> 첫째, 간 세포만을 특이적으로 감염하는 B형 간염 바이러스에서 유래한 재조합 바이러스는 간 세포에만 감염할 것이므로 세포 특이성을 갖춘 매우 안전한 유전자 치료를 가능하게 해준다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 HBV백터로 제조된 재조합 HBV 바이러스는 ex vivo 치료 뿐 아니라 ex vivo 치료에 비하여 치료비용이 훨씬 저렴하고 간편한 in vivo 치료가 가능하다.
- <160> 둘째, B형 간염 바이러스에 이미 감염된 만성 감염자는 바이러스의 복제에 필요한 코아 단백질과 폴리머라제가 항시 발현되고 있다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 HBV백터에 치료용 유전자가 삽입된 재조합 바이러스가 HBV 만성감염자의 간세포에서는 복제가 지속적으로 가능할 것이다. 즉, 만성 감염자의 간 세포가 일종의 헬퍼(즉, 복제에 필요한 단백질 제공)역할을 수행하므로 치료유전자가 삽입된 바이러스가 지속적으로 복제하여 치료용 유전자의 지속적으로 발현될 것이다. 이러한 특징은 만성감염자의 바이러스 증식을 억제하는 치료법으로 활용된다.
- <161> 셋째, 상기에서 기술하였듯이 B형 간염 바이러스에 이미 감염된 만성 감염자는 바

이러스의 복제에 필요한 코아 단백질과 폴리머라제가 항시 발현되고있다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 HBV백터에 치료용 유전자가 삽입된 재조합DNA를 만성감염자의 간 세포에 직접 주입하면 재조합 바이러스가 HBV 만성감염자의 간 세포에서는 복제가 지속적으로 가능할것이다. 이러한 특징은 만성감염자의 바이러스 증식을 억제하는 DNA 치료법으로 활용된다.

<162> 또한 본 발명에서 제공하는 HBV백터는 다음과 같은 특징이 있으며, 아래의 이유 등에서 선행 기술인 미국특허 제 5,981,274호 보다 현저한 효과가 있다.

<163> 첫째, 선행기술인 미국특허 제 5,981,274호는 매우 작은 유전자(267bp)를 삽입한 경우로 진정한 유전자 치료용 백터라고 분류되기 어려운데 반하여, 본 발명은 HBV 유전자의 1.5kb정도의 부위(HBV_{ayw}의 nt 3052-1374)가 결손 가능부위임(dispensable region)을 규명함으로써 치료용 외부 유전자를 삽입할 부위를 제공한다.

<164> 둘째, 외부유전자를 삽입하여 유전자 복제를 입증하여 실제 야생형보다 약 0.7kb가 큰 유전자가 삽입이 가능함을 입증함으로써 실제 약 2.2 kb(1.5 kb + 0.7 kb)의 외부 유전자가 삽입 가능함을 제시하였다. 즉 HBV는 유전자 크기가 3.2 kb인 매우 작은 바이러스이지만 실제 2.2kb까지 삽입이 가능함을 제시함으로써 많은 치료용 유전자를 HBV 백터에 활용할 수 있음을 제시하였다.

<165> 셋째, B형 간염 바이러스의 복제에 필요한 단백질을 코딩하는 부위에 외부 유전자(예, GFP 유전자)를 삽입하기 때문에 유전자 백터 자체로는 복제가 불가능하므로 안전하다.

<166> 넷째, 삽입되는 유전자는 B형 간염 바이러스의 pre-S2 프로모터에 의해 전사되므로 간 세포에서 매우 높은 발현이 가능하게 한다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

HBV 유전자를 포함하는 서열정보 1에 기재된 재조합 HBV 벡터인 R015(pCMV-HBV/30) 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기의 벡터는 상기의 HBV 유전자 중 복제에 필요한 일부분의 유전자가 결손된 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

상기의 벡터는 상기의 HBV 유전자 중 복제에 불필요한 일부분의 유전자가 결손된 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 4】

제 2 항에 있어서,

상기의 복제에 필요한 일부분의 유전자가 결손된 벡터는 R021, R022, R045, R028, R035 및 R029으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종의 벡터인 것을 특징으로 하는 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

여기서 R021은 서열정보 1에 기재된 R015 염기서열 중 640에서 998까지가 결손된 것이고, R022는 843에서 1363, R045는 1020에서 1363, R028은 2782에서 3167, R035는 2970에서 3167, R029는 3167에서 3247까지 결손된 것이다.

【청구항 5】

제 3 항에 있어서,

상기의 복제에 불필요한 일부분의 유전자가 결손된 벡터는 R044, R023, R040, R041, R025, R026 및 R027로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종의 벡터인 것을 특징으로 하는 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

여기서 R044는 서열정보 1의 R015 염기서열 중 1233에서 1363까지가 결손된 것이고, R023은 1363에서 1492, R040은 1492에서 1853, R041은 1853에서 2190, R025는 2190에서 2601, R026은 2601에서 2737, R027은 2737에서 2782까지가 결손된 것이다.

【청구항 6】

제 3 항 또는 제 5 항에 있어서,

상기의 플라스미드 벡터는 HBV 복제에 필수적인 염기서열인 시스-엘리먼트인 서열정보 1의 염기 중 알파부위(nt. 2662-3052; R015 염기서열 843-1233), 베타부위(nt. 1374-1419; R015 염기서열 2737-2782) 및 감마부위(nt. 1607-1804; R015 염기서열 2970-3167)을 포함하는 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 7】

제 1 항 내지 제 5 항에 있어서,

상기의 플라스미드 벡터의 표적세포는 간 세포인 것을 특징으로 하는 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서,

상기의 벡터는 이중 유전자를 삽입하기 위해 R015 염기서열 중 1233에서 2737까지가 결실된 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

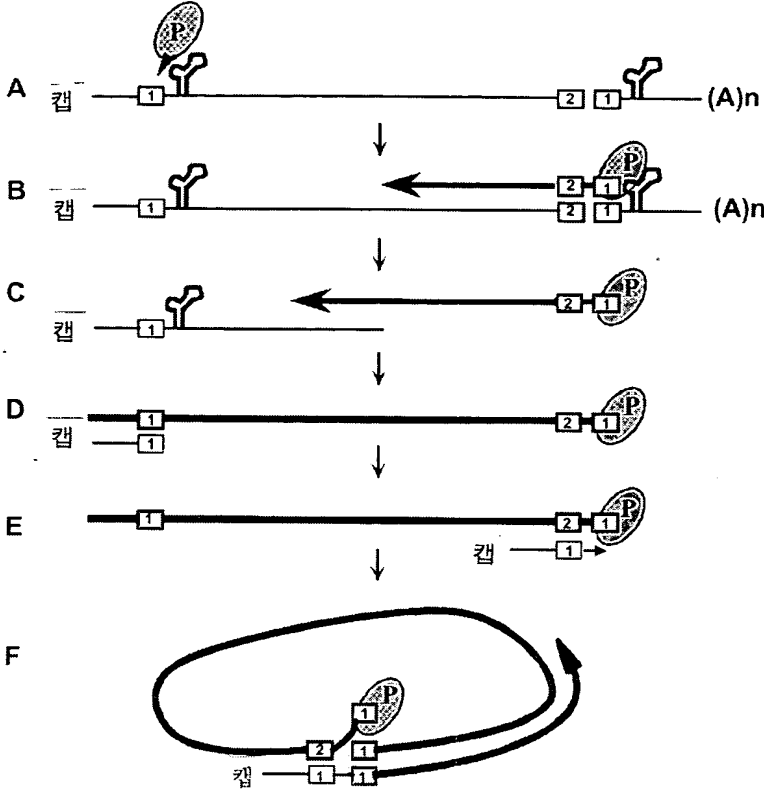
【청구항 9】

제 1 항 내지 5 항 또는 8 항에 있어서,

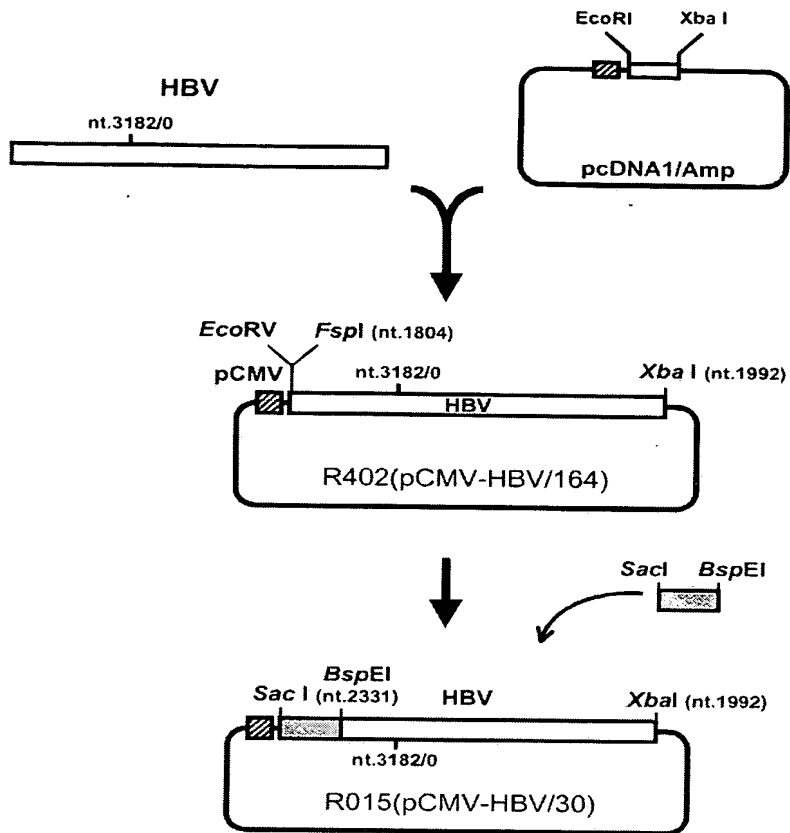
상기의 벡터에 이중 유전자인 녹색형광단백질이 삽입된 재조합 HBV 벡터인 서열정보 2에 기재된 R704 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

여기서 상기의 벡터는 HBV 유전자 복제에 필요한 코아 단백질과 폴리머레이즈가 제공되면 이중 유전자가 삽입하여도 복제가 가능하다.

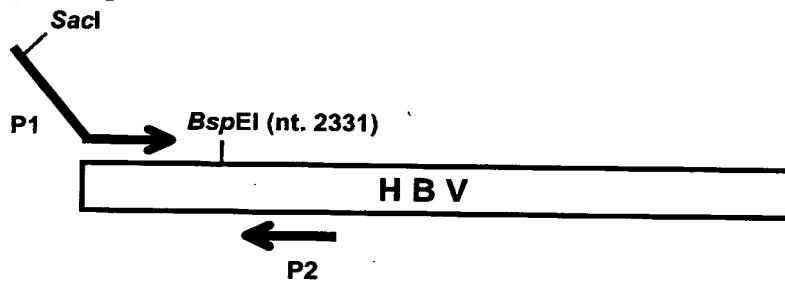
【도 1c】



【도 2a】

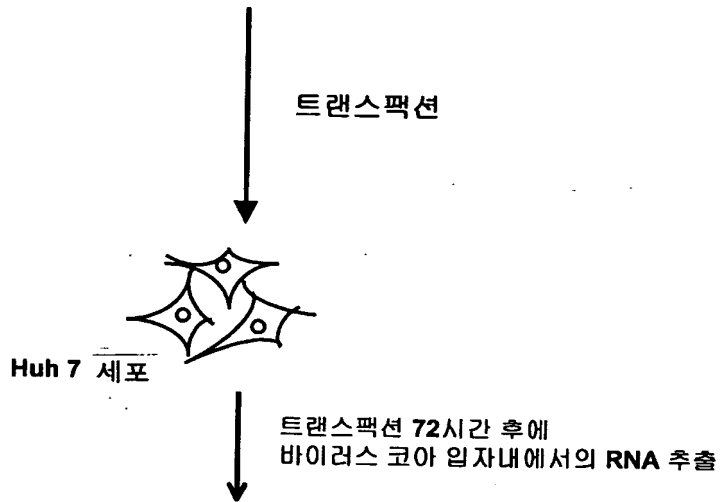


【도 2b】



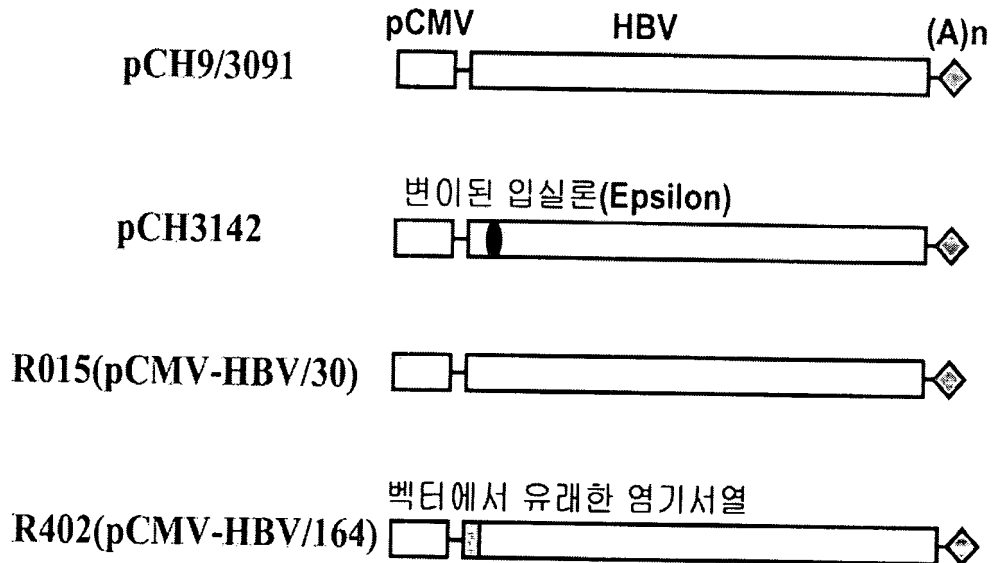
【도 3a】

HBV 프리게노믹 RNA 발현 플라스미드

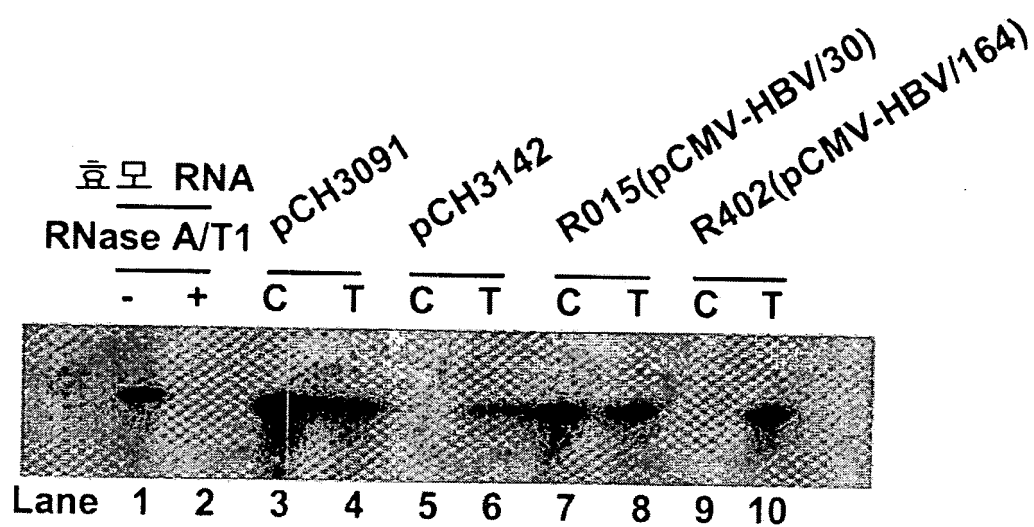


Rnase 프로텍션 법

【도 3b】

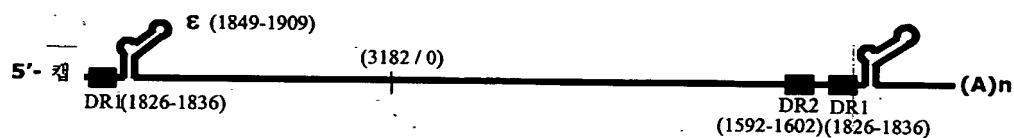


【도 3c】



【도 4】

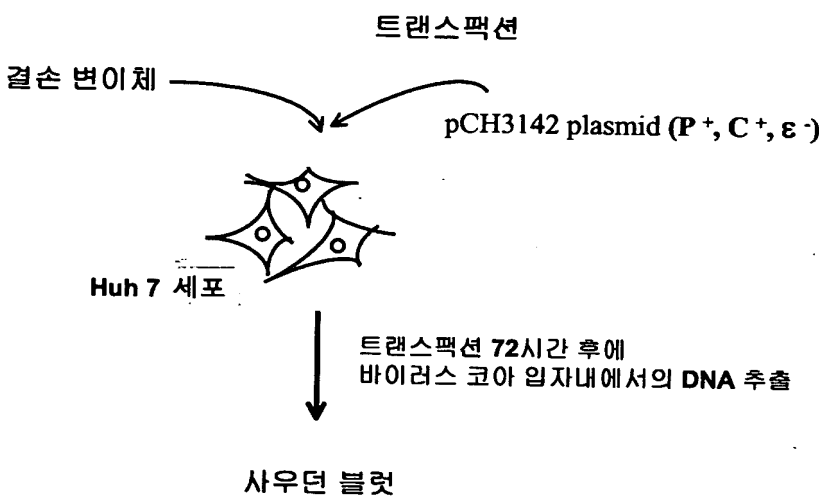
A. B형 간염바이러스 프리게노믹 RNA 구조



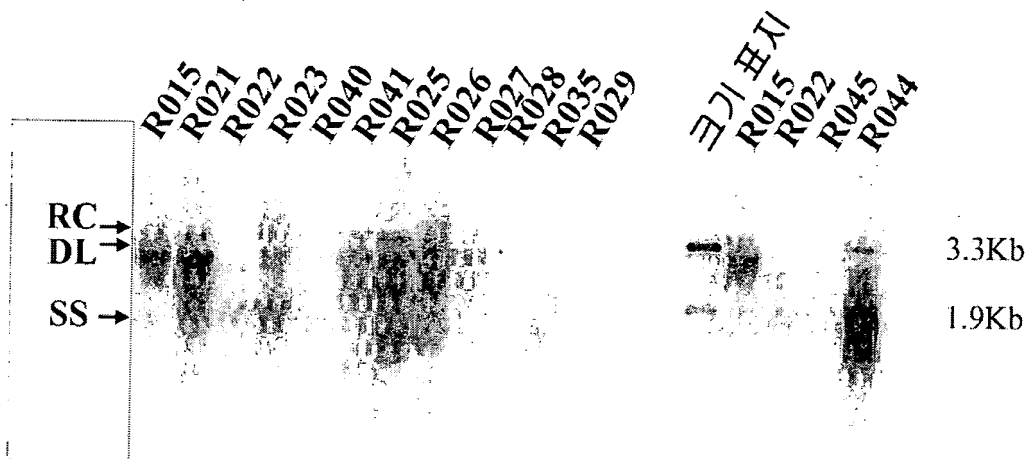
B. 결손 변이체

유전자복제여부	
O	<u>R021(Δ358)</u> 2459-2817
X	<u>R022(Δ 520)</u> 2662-3182/0
X	<u>R045(Δ 343)</u> 2839-3182/0
O	<u>R044(Δ 136)</u> 3052-3182/0
O	<u>R023(Δ 129)</u> 3182/0-129
O	<u>R040(Δ 361)</u> 129-490
O	<u>R041(Δ 347)</u> 490-827
O	<u>R025(Δ 411)</u> 827-1238
O	<u>R026(Δ 136)</u> 1238-1374
X	<u>R027(Δ 45)</u> 1374-1419
X	<u>R028(Δ 385)</u> 1419-1804
X	<u>R035(Δ 197)</u> 1607-1804
X	<u>R029(Δ 80)</u> 1804-1884

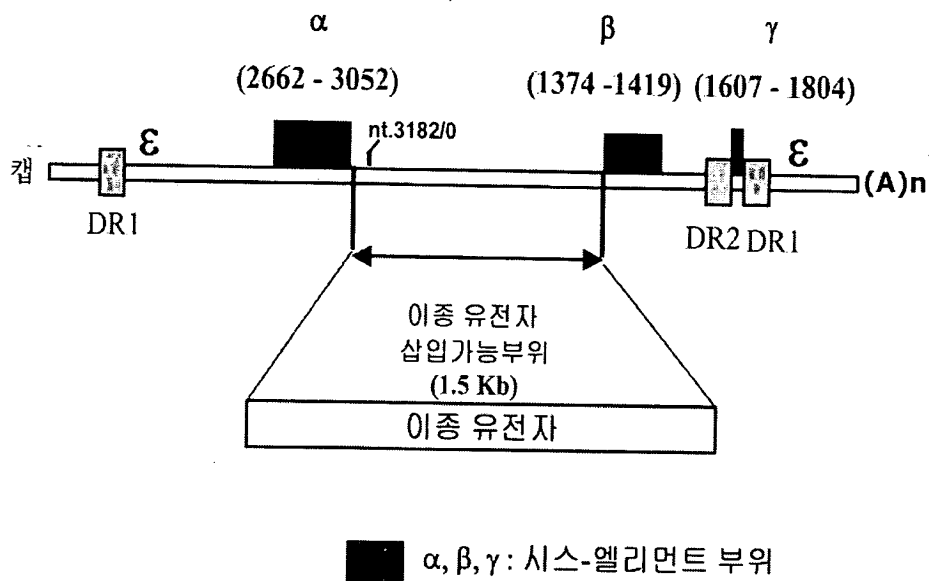
【도 5a】



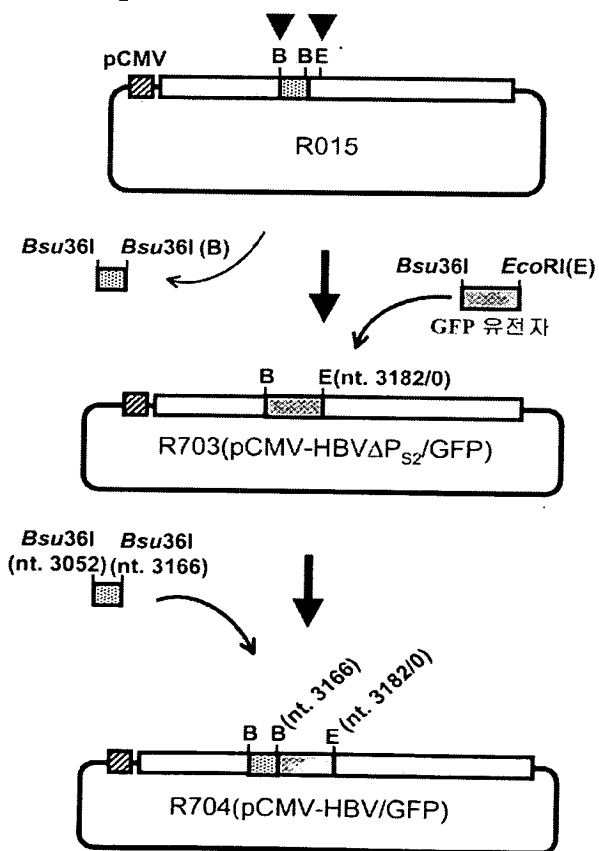
【도 5b】



【도 6】








【도 7a】

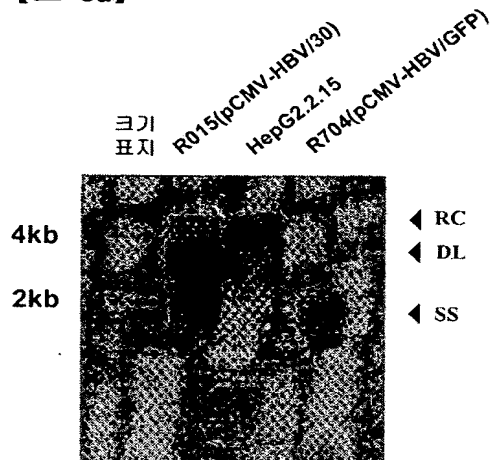


GFPEcoR(P2) : 5' - GGAATTCCGTTCATCCATGCCATGTG - 3'

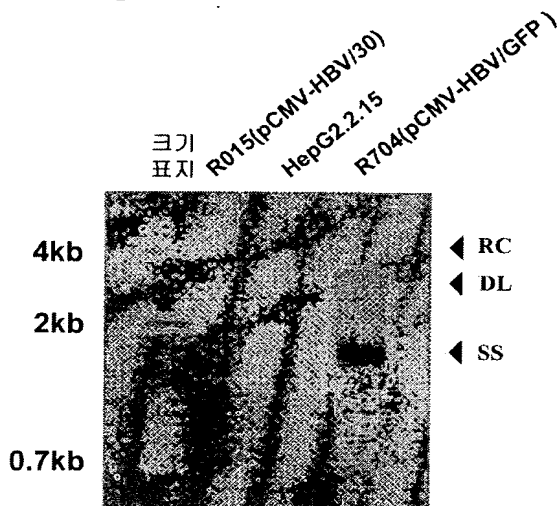
The diagram illustrates the structure of the GFP reporter gene construct. It features a linear arrangement of genetic elements: a DR1 repeat, an epsilon (ε) spacer, an alpha (α) gene, a promoter (indicated by an arrow), a beta (β) gene, a gamma (γ) gene, another DR2 repeat, a third DR1 repeat, and a final epsilon (ε) spacer. The construct terminates with a poly(A) tail, denoted as (A)_n. A specific genomic region between nucleotide positions 3166 and 3182 is identified and expanded into a box labeled GFP, showing its location within the overall construct.

-  Pre-S2 promoter 부위
 α , β , γ 시스-엘리먼트 부위
 DR1, DR2
 GFP
 전자개시 부위

【도 8a】



【도 8b】



【서열목록】

<110> RYU, Wang Shick <120> Recombinant HBV plasmid vector for gene
 therapy <130> 00dpa-112 <160> 8 <170> KOPATIN 1.0
 <210> 1 <211> 8007 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Recombinant HBV plasmid vector, R015 <220>
 <221> gene <222> (1)..(3360) <223> HBV-ayw sequence
 <220> <221> polyA_signal <222> (3281)..(3286) <220>

<21> gene <22> (6462)..(7405) <23> ampicillin gene
 <20> <21> promoter <22> (7406)..(7999) <23> CMV
 promoter <400> 1 aactttttca cctctgccta atcatctctt gttcatgtcc tactgttcaa
 gcctccaagc 60 tgtgccttgg gtggctttgg ggcatggaca tcgaccctta taaagaattt ggagctact
 120 tggagttact ctcgtttttg cttctgact tctttccttc agtacgagat cttctagata 180
 ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata 240 ctgcactca
 gcaagcaatt ctttgctggg gggaactaat gactctagct acctgggtgg 300 gtgttaattt ggaagatcc
 gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc aacactaata 360 tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgttg
 ttcacatttc ttgtctcact ttggaagag 420 aaacagttat agagtatttg gtgtctttcg gagtgtgga
 tcgcactcct ccagcttata 480 gaccacaaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgttgt
 agacgacgag 540 gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcagacg aaggtctcaa tcgccgcgt
 600 gcagaagatc tcaatctcgg gaatctcaat gttagtattc cttggactca taaggtgggg 660
 aactttactg ggctttattc ttctactgta cctgtcttta atcctcattg gaaaacacca 720 tcttttct
 atatacatth acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca gttttaggc 780 ccactcacag ttaatgaga
 aagaagattg caattgatta tgccctgccag gttttatcca 840 aaggttacca aatatttacc attggataa
 ggtattaaac cttattatcc agaacatcta 900 gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacact
 tatggaaggc gggatatatta 960 tataagagag aaacaacaca tagcgctca ttttgtgggt caccatatt
 ttgggaacaa 1020 gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgacc
 1080 ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattgggact tcaatcccaa 1140
 caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tgggtttcac 1200 cccaccgca
 ggaggccttt tggggtggag ccctcaggct cagggcatac taaaacttt 1260 gccagcaaat ccgcctcct

cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc ctaccccgt 1320 gtctccacct ttgagaaaca ctcatcctc
 ggccatgcag tggaattcca caaccttcca 1380 ccaaactctg caagatccca gagtgaagagg cctgtattt
 cctgctgggtg gctccagttc 1440 aggaacagta aacctgttc tgactactgc ctctccctta tcgtcaatc
 tctcgaggat 1500 tggggaccct gcgctgaaca tggagaacat cacatcagga ttcttaggac cccttctcg
 1560 gttacaggcg gggtttttct tgttgacaag aatcctcaca ataccgcaga gtctagactc 1620
 gtggtggact tctctcaatt ttctaggggg aactaccgtg tgtcttggcc aaaattcgca 1680 gtccccaac
 tccaatcact caccaacctc ttgtcctcca acttgtcctg gttatcgctg 1740 gatgtgtctg cggcgtttt
 tcatcttctt ctctatcctg ctgctatgcc tcatcttctt 1800 gttggttctt ctggactatc aaggtatgt
 gcccgtttgt cctctaattc caggatcctc 1860 aacaaccagc acgggacat gccggacctg catgactac
 gctcaaggaa cctctatgta 1920 tccctcctgt tgctgtacca aaccttcgga cggaattgc acctgtatt
 ccatcccatc 1980 atcctgggct ttcgaaaaat tcctatggga gtgggcctca gccgtttct cctggctca
 2040 ttactagtgc ccatttgctc agtgggtcgt agggctttcc cccactgttt ggctttcagt 2100
 tatatggatg atgtggtatt gggggccaag tctgtacagc atcttgagtc cctttttacc 2160 gctgttacc
 attttctttt gtctttgggt atacatttaa accctaacaa aacaaagaga 2220 tggggttact ctctaaatt
 tatgggttat gtcattggat gttatgggtc cttgccacaa 2280 gaacacatca tacaaaaaat caagaatg
 tttagaaaac ttctattaa caggcctatt 2340 gattggaaag tatgtcaacg aattgtgggt cttttgggt
 ttgtgcccc ttttacaaa 2400 tgtggttatc ctgcgttgat gcctttgtat gcatgtattc aatctaagc
 ggctttcact 2460 ttctcgccaa ctacaaggc ctttctgtgt aaacaatacc tgaaccttta cccgttgc
 2520 cggcaacggc caggtctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa cccctactgg ctggggcttg 2580
 gtcattgggc atcagcgcat gcgtggaacc ttttcggctc ctctgccgat ccatactgcg 2640 gaactccta
 ccgcttgttt tgctcgcagc aggtctggag caaacattat cgggactgat 2700 aactctgttg tcctatccc

caaatataca tcgtttccat ggctgctagg ctgtgctgcc 2760 aactggatcc tgcgcgggac gtcctttgt
 tacgtcccgt cggcgctgaa tcctgcggac 2820 gacccttctc ggggtcgctt gggactctct cgtcccctt
 tccgtctgcc gttccgaccg 2880 accacggggc gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctc
 tctgccggac 2940 cgtgtgcaact tcgcttcacc tctgcacgtc gcatggagac caccgtgaac gccaccaa
 3000 tattgcccaa ggtcttacat aagaggactc ttggactctc agcaatgtca acgaccgacc 3060
 ttgaggcata cttcaaagac tgtttgttta aagactggga ggagttgggg gaggagatta 3120 ggtaaagg
 ctttgtacta ggaggctgta ggcataaatt ggtctgcgca ccagcaccat 3180 gcaacttttt cacctctgc
 taatcatctc ttgttcatgt cctactgttc aagcctccaa 3240 gctgtgcctt ggggtggcttt ggggcatgg
 catcgaccct tataaagaat ttggagctac 3300 tgtggagtta ctctcgtttt tgccttctga cttctttcc
 tcagtacgag atcttctaga 3360 gggccctatt ctatagtgtc acctaaatgc tagaggatct ttgtgaagg
 acctacttc 3420 tgtggtgtga cataattgga caaactacct acagagattt aaagctctaa ggtaaatat
 3480 aaatttttaa gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttgtgt attttagatt 3540
 ccaacctatg gaactgatga atgggagcag tgggtggaatg cctttaatga ggaaaacctg 3600 ttttgcctca
 aagaaatgcc atctagtgat gatgaggcta ctgctgactc tcaacattct 3660 actcctccaa aaaagaaga
 aaaggtagaa gacccaagg actttccttc agaattgcta 3720 agttttttga gtcattgtgt gtttagtaa
 agaactcttg cttgctttgc tatttacacc 3780 acaaaggaaa aagctgcact gctatacaag aaaattatg
 aaaaatatat gatgtatagt 3840 gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta gaggtttta
 ttgcttttaa 3900 aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgta
 3960 cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa 4020
 taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta 4080 tcattgtctg
 atcatccgc catggtatca acgcatatt tctatttaca gtagggacct 4140 cttcgttgtg taggtaccg

tgtattccta gggaaatagt agaggcacct tgaactgtct 4200 gcatcagcca tatagcccc gctgttcga
 ttacaaacac aggcacagta ctgacaaacc 4260 catacacctc ctctgaaata cccatagttg ctagggctg
 ctccgaactc attacaccct 4320 ccaaagtcag agctgtaatt tcgccatcaa gggcagcgag ggcttctcc
 gataaaatag 4380 cttctgccga gagtcccgta agggtagaca cttcagctaa tccctcgatg aggtctact
 4440 gaatagtcag tgcggctccc attttgaaaa ttcacttact tgatcagctt cagaagatgg 4500
 cggagggcct ccaacacagt aattttcttc ccgactctta aaatagaaaa tgtcaagtca 4560 gttaagcag
 aagtggacta actgacgcag ctggccgtgc gacatcctct ttttaattagt 4620 tgctaggcaa cgccctcca
 agggcgtgtg gttttgcaag aggaagcaaa agcctctcca 4680 cccaggccta gaatgtttcc acccaatca
 tactatgaca acagctgttt tttttagtat 4740 taagcagagg ccggggaccc ctgggcccggc ccgcttact
 tggagaaaaa gaagagaggc 4800 attgtagagg cttccagagg caacttgtca aaacaggact gcttctatt
 ctgtcacact 4860 gtctggccct gtcacaaggt ccagcacctc cataccccct ttaataagca gtttgggaa
 4920 ggggtgcgggt cttactccgc ccaccccgcc cctaactccg cccagttccg cccattctcc 4980
 gccccatggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gaggccgcct cggcctctga 5040 gctattcca
 aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca aaaagctaata 5100 tcggcgtaat ctgctgctt
 caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc 5160 cggatcaaga gctaccaact cttttccg
 aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 5220 caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacc
 cttcaagaac tctgtagcac 5280 cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccag
 ggcgataagt 5340 cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggc
 5400 gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 5460
 acctacagcg tgagcatlga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt 5520 atccggtaa
 cggcaggggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 5580 cctggatatct ttatagtcc

gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatTTTTgt 5640 gatgctcgtc aggggggagg agcctatgg
 aaaacgccag caacgcaagc tagcttctag 5700 ctagaaattg taaacgttaa tttttgtta aaattcgcg
 taaatttttg ttaaattcagc 5760 tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaa
 agaatagccc 5820 gagatagggt tgagtgtgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtgga
 5880 tccaacgtca aaggcgcaaa aaccgtctat caggcgatg gccgcccact acgtgaacca 5940
 tcacccaaat caagtttttt ggggtcagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa 6000 gggagcccc
 gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaagg 6060 aagaaagcga aaggagcgg
 cgctagggag ctggcaagt tagcggtcac gctgcgcgta 6120 accaccacac ccgcccgcgt taatgcgcc
 ctacagggag cgtactatgg ttgctttgac 6180 gagaccgtat aacgtgcttt cctcgttga atcagagcg
 gagctaaaca ggaggccgat 6240 taaagggtt ttagacagga acgttacgcc agctggatta ccaaaggcg
 tcgtgatacg 6300 cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcactt
 6360 tcggggaaat gtgcgcgga cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 6420
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 6480 gagtattca
 catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttccgtg 6540 ttttgctcac ccagaaacg
 tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcag 6600 agtgggttac atcgaactgg atctcaaca
 cggtaaagtc cttgagagtt ttcgccccga 6660 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgct
 tgtggcgagg tattatcccc 6720 tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcag
 atgacttgg 6780 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattat
 6840 cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcg 6900
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 6960 tcgttggga
 ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 7020 tgcagcaatg gcaacaacg

tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 7080 ccggcaacaa ttaatagact ggatggagg
 ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 7140 ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgg
 gccggtgagc gtgggtctcg 7200 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgta
 ttatctacac 7260 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcct
 7320 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 7380
 aaaacttcat ttttaatttc tctagcgcgt tgacattgat tattgactag ttattaatag 7440 taatcaatt
 cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt 7500 acggtaaattg gcccgctg
 ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg 7560 acgtatgttc ccatagtaac gccaatagg
 actttccatt gacgtcaatg ggtggactat 7620 ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtat
 atatgccaag tacgccccct 7680 attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg ccagtaga
 gaccttatgg 7740 gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcg
 7800 ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cgtttgact cacggggatt tccaagtctc 7860
 caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa 7920 tgtcgtaac
 actccgcccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc 7980 tatataagca gagctctct
 gctaact 8007 <210> 2 <211>
 8676 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Recombinant HBV plasmid vector, R704 <220> <221> gene <222>
 (1)..(1352) <223> HBV-ayw gene <220> <221> gene <222>
 (1353)..(2031) <223> Green Fluorescent Protein gene <220> <221>
 gene <222> (2032)..(4029) <223> HBV-ayw gene <220>
 <221> polyA_signal <222> (3950)..(3955) <220> <221>

source <222> (4030)..(8676) <223> from pcDNA1/Amp <220>
 <221> gene <222> (7131)..(8074) <223> ampicillin gene
 <220> <221> promoter <222> (8075)..(8668) <223> CMV
 promoter <400> 2 aactttttca cctctgccta atcatctctt gttcatgtcc tactgttcaa
 gcctccaagc 60 tgtgccttgg gtggctttgg ggcatggaca tcgaccctta taaagaattt ggagctact
 120 tggagttact ctcgtttttg cttcttgact tctttccttc agtacgagat cttctagata 180
 ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata 240 ctgcactca
 gcaagcaatt ctttgctggg gggaactaat gactctagct acctgggtgg 300 gtgttaattt ggaagatcc
 gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc aacactaata 360 tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttggtg
 ttcacatttc ttgtctcact tttggaagag 420 aaacagttat agagtatttg gtgtctttcg gagtgtgga
 tcgcactcct ccagcttata 480 gaccacaaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgtttg
 agacgacgag 540 gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcgagacg aaggtctcaa tcgccgcgt
 600 gcagaagatc tcaatctcgg gaatctcaat gttagtattc cttggactca taaggtgggg 660
 aactttactg ggctttattc ttctactgta cctgtcttta atcctcattg gaaaacacca 720 tcttttct
 atatacatit acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca gttttaggc 780 cactcacag ttaatgaga
 aagaagattg caattgatta tgcctgccag gttttatcca 840 aaggttacca aatatttacc attggataa
 ggtattaaac cttattatcc agaacatcta 900 gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacact
 tatggaaggc gggtatatta 960 tataagagag aaacaacaca tagcgcctca ttttggtgggt caccatatt
 ttgggaacaa 1020 gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgacc
 1080 ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattgggact tcaatcccaa 1140
 caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tgggtttcac 1200 cccaccgca

ggaggccttt tggggtggag ccttcaggct cagggcatac tacaaacttt 1260 gccagcaaat cgcctcct
cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc ctaccccgct 1320 gtctccacct ttgagaaaca ctcatctc
ggagatgagt aaaggagaag aacttttcac 1380 tggagtgtc ccaattctta tggatgatt aatgggcac
aattttctgt cagtggagag 1440 ggtgaagggtg atgcaacatt acccttaaatt ttatttgac tactggaaa
ctacctgttc 1500 catggccaac actgttact atgggtgtca atgcttttca agataccag atcatatga
1560 acagcatgac tttttcaaga gtgcatgcc cgaagggtat gtacaggaaa gaactatatt 1620
tttcaaagat gacgggaact acaagacacg tgctgaagtc aagtttgaag gtgataacct 1680 tgtaatatag
atcgagttaa aaggtattga ttttaaagaa gatggaaaca ttcttgaca 1740 caaattggaa tacaactat
actcacacaa tgtatacatc atggcagaca aacaaaagaa 1800 tggaatcaaa gtaacttca aaattagac
caacattgaa gatggaagcg ttcaactagc 1860 agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggccc
gtccttttac cagacaacca 1920 ttacctgtcc acacaatctg ccttttcgaa agatcccaac gaaaagaga
accacatggt 1980 cttcttgag ttgtaacag ctgctgggat tacacatggc atggatgaac ggaattcca
2040 aaccttccac caaactctgc aagatccag agtgagaggc ctgtatttcc ctgctggtg 2100
ctccagtcca ggaacagtaa accctgttct gactactgcc tctcccttat cgtcaatctt 2160 ctgaggat
ggggaccctg cgctgaacat ggagaacatc acatcaggat tctaggacc 2220 cttctcgtg ttacaggcg
ggtttttctt gttgacaaga atcctcacia taccgcagag 2280 tctagactcg tggtagactt ctctcaatt
tctaggggga actaccgtgt gtcttggcca 2340 aaattcgag tcccaacct ccaatcact accaacctc
tgtctccaa cttgtcctgg 2400 ttatcgctgg atgtgtctgc ggcgttttat catcttctc ttcatcctg
tgctatgctt 2460 catcttcttg ttggttcttc tggactatca aggtatgtt cccgtttgtc ctctaattc
2520 aggatcctca acaaccagca cgggacctg ccggacctgc atgactactg ctcaaggaaac 2580
ctctatgtat cctcctgtt gctgtacaa accttcggac ggaaattgca cctgtattcc 2640 catcccatc

tcctgggctt tcggaaaatt cctatgggag tgggcctcag cccgtttctc 2700 ctggctcagt ttactagt
 catttgttca gtggttcgta gggctttccc ccactgtttg 2760 gctttcagtt atatggatga tgtggtatt
 ggggccaagt ctgtacagca tcttgagtcc 2820 ctttttaccg ctgttaccaa tttcttttg tctttgggt
 tacatttaaa ccctaacaaa 2880 acaaagagat ggggttactc tctaaatfff atgggttatg tcattggat
 ttatgggtcc 2940 ttgccacaag aacacatcat acaaaaaatc aaagaatggt ttagaaaact tcctattaa
 3000 aggcctattg attggaaagt atgtcaacga attgtgggtc ttttgggttt tgctgccct 3060
 ttacacaat gtggttatcc tgcgttgatg cctttgtatg catgtattca atctaagcag 3120 gctttcact
 tctcgccaac ttacaaggcc tttctgtgta aacaatacct gaacctttac 3180 cccgttgccc ggcaacggc
 aggtctgtgc caagtgtttg ctgacgcaac cccactggc 3240 tggggcttgg tcatgggcca tcagcgcat
 cgtggaacct tttcggtcc tctgccgac 3300 catactgcgg aactcctagc cgcttgtttt gctcgcagc
 ggtctggagc aacattatc 3360 gggactgata actctgttgt cctatcccgc aaatatacat cgtttccat
 gctgctaggc 3420 tgtgctgcca actggatcct gcgcgggacg tcctttgttt acgtcccgtc ggcgctgaa
 3480 cctgcggacg acccttctcg gggctgcttg ggactctctc gtccccttct ccgtctgccg 3540
 ttccgaccga ccacggggcg cacctctctt tacgcggact cccgtctgt gccttctcat 3600 ctgccggac
 gtgtgcactt cgcttcacct ctgcacgtcg catggagacc accgtgaacg 3660 cccaccaaatt attgcccac
 gtcttacata agaggactct tggactctca gcaatgtcaa 3720 cgaccgacct tgaggcatac ttcaaagac
 gtttgtttaa agactgggag gagttggggg 3780 aggagattag gttaaaggtc tttgtactag gaggctgta
 gcataaattg gtctgcgcac 3840 cagcaccatg caacttttc acctctgcct aatcatctct tgttcatgt
 ctactgttca 3900 agcctccaag ctgtgccttg ggtggctttg gggcatggac atcgacctt ataaagaat
 3960 tggagctact gtggagttaac tctcgttttt gccttctgac ttctttcctt cagtacgaga 4020
 tcttctagag ggccctattc tatagtgtca cctaaatgct agaggatcct tgtgaaggaa 4080 ccttacttc

gtggtgtgac ataattggac aaactaccta cagagattta aagctctaag 4140 gtaaataataa aatttttaa
tgtataatgt gttaaaactac tgattctaata tgtttgtgta 4200 ttttagattc caacctatgg aactgatga
tgggagcagt ggtggaatgc ctttaatgag 4260 gaaaacctgt tttgctcaga agaaatgcca tctagtgat
atgaggctac tgctgactct 4320 caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag accccaagg
ctttccttca 4380 gaattgctaa gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata gaactcttgc ttgctttgc
4440 atttacacca caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga aaattatgga aaaatatttg 4500
atgtatagtg ccttgactag agatcataat cagccatacc acattttag aggttttact 4560 tgctttaaa
aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt 4620 tgttgtaac ttgtttatt
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatacaaaa 4680 tticacaaat aaagcatitt tticactgc
ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 4740 tgtatcttat catgtctgga tcatcccgcc atggtatca
cgccatattt ctatttacag 4800 tagggacctc ttctgtgtg aggtaccgct gtattcctag ggaaatagt
gaggcacctt 4860 gaactgtctg catcagccat atagcccccg ctgttcgact tacaacaca ggcacagta
4920 tgacaaacc atacacctc tctgaaatac ccatagttgc tagggctgtc tccgaactca 4980
ttacacctc caaagtcaga gctgtaattt cgccatcaag ggcagcgagg gcttctccag 5040 ataaaatag
ttctgccgag agtcccgtaa gggtagacac ttcagctaata cctcgatga 5100 ggtctactag aatagtcag
gcggtccca ttttgaaaat tcaattactt gatcagcttc 5160 agaagatggc ggagggcctc caacacagt
attttcctcc cgactcttaa aatagaaaat 5220 gtcaagtcag ttaagcagga agtggactaa ctgacgcag
tggccgtgcg acatcctctt 5280 ttaattagtt gctaggcaac gccctccaga gggcgtgtgg ttttgcaag
ggaagcaaaa 5340 gcctctccac ccaggcctag aatgtttcca ccaatcatt actatgacaa cagctgttt
5400 ttttagtatt aagcagaggc cggggacccc tgggccggcc cgcttactct ggagaaaaag 5460
aagagaggca ttgtagaggc ttccagaggc aacttgtcaa aacaggactg ctctatttc 5520 tgtcacact

tctggccctg tcacaaggtc cagcacctcc atacccctt taataagcag 5580 tttgggaacg ggtgcgggt
ttactccgcc catccgccc ctaactccgc ccagttccgc 5640 ccattctccg ccccatggct gactaattt
ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc 5700 ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggcttttt
ggaggcctag gcttttgcaa 5760 aaagctaatt cggcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgct
ccagcggtagg 5820 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcaga
5880 cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact 5940
ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagt 6000 gcgataagt
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 6060 ggtcgggctg aacgggggg
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 6120 aactgagata cctacagcgt gagcattga
aaagcgccac gttcccgaa gggagaaagg 6180 cggacaggta tccggttaagc ggcagggtcg gaacaggag
gcgcacgagg gagcttccag 6240 ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctg
cttgagcgtc 6300 gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcaagc
6360 agcttctagc tagaaattgt aaacgttaat attttgtaa aattcgcgtt aaattttgt 6420
taaatacagct cattttttaa ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa 6480 gaatagccc
agatagggtt gagtgttgtt ccagtttggga acaagagtcc actattaaag 6540 aacgtggact ccaacgtca
agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg ccgcccacta 6600 cgtgaaccat cacccaaatc aagttttt
gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg 6660 aaccctaaag ggagcccccg atttagagct tgacgggga
agccggcgaa cgtggcgaga 6720 aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtg
agcggtcacg 6780 ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtactatgg
6840 tgctttgacg agaccgtata acgtgtttc ctcgttggaa tcagagcggg agctaaacag 6900
gaggccgatt aaagggtatt tagacaggaa cggtacgcca gctggattac caaaggcct 6960 cgtgatacg

ctatatttat aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg 7020 tggcactttt cggggaaat
tgcgcggaac ccctatttgt ttatatttct aaatacattc 7080 aaatatgtat ccgctcatga gacaataac
ctgataaatg cttaataat attgaaaaag 7140 gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttat
cccttttttg cggcattttg 7200 ccttcctgtt ttgctcacc cagaaacgtt ggtgaaagta aaagatgct
aagatcagtt 7260 gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagtt
7320 tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt 7380
attatcccggt gttgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa 7440 tgacttggt
gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 7500 agaattatgc agtgctgcc
taaccatgag tgataacact gcggccaact tactttctgac 7560 aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccg
ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac 7620 tcgccttgat cgttggggaac cggagctgaa tgaagccat
ccaaacgacg agcgtgacac 7680 cacgatgcct gcagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggc
aactacttac 7740 tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccac
7800 tctgcgctcg gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 7860
tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 7920 tatctacac
acgggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 7980 aggtgcctca ctgattaag
attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 8040 gattgattta aaacttcatt ttaatttc
ctagcgcgtt gacattgatt attgactagt 8100 tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagc
catatatgga gttccgcgtt 8160 acataactta cggtaaattgg cccgcctggc tgaccgcca acgaccccc
cccattgacg 8220 tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatg
8280 gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt 8340
acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcatatgc ccagtacatg 8400 accttatgg

actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg 8460 gtgatgcggt ttggcagt
catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 8520 ccaagtctcc accccattga cgtcaatgg
agtttgtttt ggcacacaaa tcaacgggac 8580 tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaa
tgggcggttag gcgtgtacgg 8640 tgggaggtct atataagcag agctctctgg ctaact
8676 <210> 3 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> HBV 1820 primer <400> 3 cccgagctct
ctggctaact aactttttca cctctgcc 38 <210> 4
<211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> HBV2839-2822 primer <400> 4 cccaagcttc tattgttccc aagaatatgg
30 <210> 5 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> GFPBsuF primer <400> 5 gtcactcctc
aggagatgag taaaggagaa g 31 <210> 6
<211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> GFPEcoR primer <400> 6 ggaattccgt tcatccatgc catgtg
26 <210> 7 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> HBV3117-34 primer <400> 7 tcaggaaggc
agcctacc 18 <210> 8
<211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> HBV310-291 primer <400> 8 ttggccaaga cacacggtag